UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal

DISSERTAÇÃO

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA E TROCAS GASOSAS EM PLANTAS DE ARROZ SOB ESTRESSES ABIÓTICOS

MARCELO NOGUEIRA DO AMARAL

Pelotas, 2015

Marcelo Nogueira do Amaral

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA E TROCAS GASOSAS EM PLANTAS DE ARROZ SOB ESTRESSES ABIÓTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientador: Dra. Letícia Carvalho Benitez

Dr. Luciano da Silva Pinto

Dr. Sidnei Deuner

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

A485a Amaral, Marcelo Nogueira do
Análise do transcriptoma e trocas gasosas em plantas de arroz sob estresses abióticos / Marcelo Nogueira do Amaral. – 67f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientador Eugenia Jacira Bolacel Braga ; coorientadores Letícia Carvalho Benitez, Luciano da Silva Pinto, Sidnei Deuner.

1.Fisiologia vegetal. 2.*Oryza sativa* L.. 3.Estresse por frio. 4.Estresse por ferro. 5.RNA-seq. 6.Estresse salino. 7.Fotossíntese. 8.Genes diferencialmemte expressos. I.Braga, Eugenia Jacira Bolacel.II.Benitez, Letícia Carvalo. III.Pinto, Luciano da Silva. IV.Deuner, Sidnei. V.Título.

CDD: 633.18

Banca examinadora:

Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Presidente da Banca)

Dr. Valmor João Bianchi

Dr. Daniel da Rosa Farias

Dr. Luciano Carlos da Maia

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a minha família pelo apoio incondicional, por sempre me incentivarem, mesmo nos momentos mais difíceis. Sem vocês eu nunca teria conseguido. Muito obrigado!

Agradeço a Professora Eugenia Jacira Bolacel Braga pela orientação, por sempre estar disposta a me ajudar e pelos ensinamentos. E principalmente pela confiança depositada em mim para realização de um trabalho que era novidade para todo o nosso grupo.

Aos meus co-orientadores, Letícia Carvalho Benitez, Sidnei Deuner e Luciano da Silva Pinto, pelos ensinamentos, dedicação, conselhos, e conversas. Por estarem sempre dispostos a me ajudar.

À Lílian Francescatto Pereira, pela amizade, carinho e amor. Por estar do meu lado em mais esta etapa, me apoiando, incentivando e aturando meus momentos de mau humor. Tua ajuda, mesmo que indireta, foi essencial para a realização desse trabalho e agradeço todos os dias por te ter ao meu lado me fazendo feliz.

Ao grupo *Oryza*, Gabriela Peres Moraes, Gabriela Rodrigues, Isabel Lopes Vighi, Letícia Benitez e Priscila Ariane Auler, pela grande amizade, ensinamento, ajuda e apoio que me deram ao longo do mestrado. E ao Professor Luciano Maia, pela amizade, pelas conversas no almoço, ensinamentos e por sempre estar disposto a ajudar o nosso grupo de trabalho.

Também agradeço ao pessoal do fitomelhoramento, Rodrigo, Solange, Daniel e Professor Antonio Costa de Oliveira pelo apoio. E principalmente ao doutorando Willian Pacheco, que mesmo de longe sempre esteve disposto a me ajudar em tudo, e que com certeza foi um dos maiores responsáveis pela elaboração desse trabalho.

À todos os colegas da Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos estudos, companheirismo e amizade.

À agência CAPES pela bolsa concedida.

Resumo

AMARAL, Marcelo Nogueira do. **Análise do transcriptoma e trocas gasosas em plantas de arroz sob estresses abióticos.** 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, sendo o Brasil o 9º maior produtor. Apesar dos bons níveis de produtividade, acredita-se que estes números sejam insuficientes para suprir o requerimento populacional no mundo, sendo necessário um aumento na produção. Entretanto, diversos estresses abióticos, como salinidade, toxidez por ferro e baixa temperatura, limitam a produtividade do arroz mundialmente. A resposta das plantas às condições estressantes é um fenômeno complexo, envolvendo alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Assim, o conhecimento do transcriptoma e análise fotossintética de plantas de arroz submetidas a estes estresses, pode auxiliar a elucidar quais vias metabólicas são alteradas e quais são as principais respostas bioquímicas e fisiológicas das plantas em tais condições. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi analisar os genes diferencialmente expressos (DEGs), através da metodologia de RNA-Seq e quantificar as trocas gasosas em folhas de arroz (cv. BRS Querência), no estádio V3, submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante o período de 24 horas. Um intervalo entre 41 - 51 milhões de *reads* foram submetidas ao alinhamento, sendo que deste total um intervalo entre 88,47 - 89,21% foram mapeadas no genoma de referência. Foi observado 5.506 genes diferencialmente expressos para o estresse por frio, 1.808 para o sal e 630 para o ferro, sendo que 330 DEGs foram comuns aos três estresses. A anotação funcional através do software MapMan demonstrou que o estresse por frio promoveu maiores alterações no metabolismo em geral. O estresse salino apresentou uma rede de interação de termos de Ontologia Gênica (GOs) sobre-representados mais complexa que os demais estresses. Nos parâmetros de trocas gasosas, a taxa assimilatória liquida foi a única que apresentou diferença significativa, com o estresse por frio apresentando a menor média. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que o estresse por baixa temperatura apresenta um maior número de genes diferencialmente expressos e que há uma maior relação entre o estresse salino e por ferro. Além disso, o estresse por frio é o que afeta mais drasticamente a fotossíntese, tanto em nível molecular quanto fisiológico, e apesar de reduções na taxa assimilatória liquida, a cultivar BRS Querência demonstrou menores alterações nos estresses salino e por excesso de ferro.

Palavras-chave: estresse por frio; estresse por ferro; estresse salino; fotossíntese; genes diferencialmente expressos; *Oryza sativa* L.; RNA-seq

Abstract

AMARAL, Marcelo Nogueira do. **Transcriptome analysis and gas exchange in rice plants under abiotic stresses.** 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Rice (*Oryza sativa* L.) is the second most cultivated cereal in the world; Brazil is the ninth biggest producer. Despite the high levels of productivity, it is believed that these numbers are insufficient to meet the population requirement in the world, demanding an increase in its production. However, various abiotic stresses, such as salinity, toxicity by iron and low temperature, limit the productivity of rice worldwide. The response of plants to stressful conditions is a complex phenomenon involving morphological, physiological, biochemical and molecular changes. Thus, the knowledge of the transcriptome and photosynthetic analysis of rice plants subjected to these stresses can help to elucidate which metabolic pathways are changed and what are the main biochemical and physiological responses of plants under such conditions. Thus, the objective of this study was to analyze the differentially expressed genes (DEGs), through the methodology of RNA-Seq and quantify gas exchanges in rice leaves (cv. BRS Querência) in V3 stage, under cold, iron and salt stress during 24 hours. A range from 41 to 51 million reads was submitted to alignment, in which a range from 88.47 to 89.21% has been mapped in the reference genome. 5,506 differentially expressed genes under cold stress were observed, as well as, 1,808 for salt and 630 for iron stress; 330 of them were similar to the three DEGs stresses. Functional annotation by MapMan software showed that, usually, cold stress promoted major changes in the metabolism. The saline stress presented a network of interaction of Gene Ontology terms (GOs) over-represented are more complex than the other stresses. In the parameters of gas exchange, the net assimilation rate was the only one significant difference, with stress by cold presenting the lowest average. From the results obtained it was possible to conclude that the low temperature stress has a greater number of differentially expressed genes and that there is a greater relationship between salt and iron stress. In addition, the cold stress is affecting more drastically photosynthesis, either in molecular-level and physiological, and despite reductions in net assimilation rate, BRS Querência showed minor changes in the salt stress and excess iron.

Keywords: cold stress; iron stress; saline stress; photosynthesis; differentially expressed genes; *Oryza sativa* L.; RNA-seq

Lista de Figuras

Artigo 1 - Transcriptômica comparativa de plantas de arroz submetidas a estresses abióticos revela diferentes graus de complexidade de rede regulatória

Figura 1	Fluxograma da metodologia empregada para o tratamento das bibliotecas de RNA-Seq.....	25
Figura 2	Sumário de todos genes expressos em folhas de arroz sob estresses por frio, ferro e sal, e dos genes diferencialmente expressos pelo valor de p < 0,01.....	28
Figura 3	*Heatmap* dos genes diferencialmente expressos em comum aos três estresses.....	30
Figura 4	Visão geral do metabolismo alterado através do software Mapman para o estresse por frio.....	31
Figura 5	Visão geral do metabolismo alterado através do software Mapman para os estresses por ferro (A) e sal (B).....	32
Figura 6	*Heatmap* dos resultados na análise de enriquecimento dos termos GOs sobre-representados.....	34
Figura 7	Representação gráfica das interações dos termos GOs para processos biológicos *Up-regulated*.....	35
Material Suplementar 1	Resultado da análise de componentes principais do Log 2Fold Change (logFC) das bibliotecas de RNA-seq para ambos os estresses na cultivar de arroz BRS Querência.....	43
Material Suplementar 2	Similaridade entre os diferentes estresses em plantas de arroz (cv. BRS Querência), com base no coeficiente de similaridade *Simple Matching* sobre os genes diferencialmente expressos.....	44

Artigo 2 - Expressão diferencial de genes relacionados à fotossíntese e quantificação de trocas gasosas em plantas de arroz sob estresses abióticos

Figura 1	Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos relacionados a fotossíntese e cloroplasto em plantas de arroz (cv. BRS Querência) submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas.....	52
Figura 2	*Heatmap* dos genes diferencialmente expressos relacionados a fotossíntese e cloroplasto em plantas de arroz (cv. BRS Querência) submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas.....	53
Figura 3	Número de DEGs totais detectados, e número de DEGs com GOs relacionados a cloroplasto e fotossíntese.....	54

Lista de Tabelas

Artigo 1 - Transcriptômica comparativa de plantas de arroz submetidas a estresses abióticos revela diferentes graus de complexidade de rede regulatória

Tabela 1	Resultados totais do alinhamento de *reads* de plantas de arroz (cv. BRS Querência) submetidas ao estresse por frio, ferro e sal durante 24h, contra o genoma de referência (cv. Nipponbare).....	27
Tabela 2	Categorização dos genes diferencialmente expressos em plantas de arroz (cv. BRS Querência) submetidas a estresse por frio, ferro e sal durante 24h de acordo com o valor de Log 2FoldChange (LogFC).....	29

Artigo 2 - Expressão diferencial de genes relacionados à fotossíntese e quantificação de trocas gasosas em plantas de arroz sob estresses abióticos

Tabela 1	Sumário dos GOs relacionados com fotossíntese e cloroplasto detectados nos DEGs de plantas de arroz (cv. BRS Querência), submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas.....	55
Tabela 2	Taxa de assimilação líquida CO_2 (*A*), condutância estomática (*gS*), concentração intercelular de CO_2 (*Ci*), transpiração foliar (*Tr*) e eficiência do uso da água (UEA) em plantas de arroz (BRS Querência), submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas.....	56

Sumário

1 Introdução Geral.....10
Referências bibliográficas 15

Artigo 1 - Transcriptômica comparativa de plantas de arroz submetidas a estresses abióticos revela diferentes graus de complexidade de rede regulatória

Resumo.....19
Abstract.....20
Introdução 21
Material e Métodos.....22
Resultados 26
Discussão.....36
Conclusão 38
Referências bibliográficas 38
Material Suplementar 43

Artigo 2 - Expressão diferencial de genes relacionados à fotossíntese e quantificação de trocas gasosas em plantas de arroz sob estresses abióticos

Resumo.....45
Abstract.....46
Introdução 47
Material e Métodos.....48
Resultados 51
Discussão.....57
Conclusão 61
Referências bibliográficas 61

1 Introdução Geral

Atualmente, o arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, ficando apenas atrás apenas do milho. Em nível mundial, a China ocupa a primeira posição, com uma produção de 197,2 milhões de toneladas, enquanto o Brasil aparece em 9° lugar, produzindo 11,9 milhões de toneladas (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO, 2013). Para a atual safra agrícola brasileira (2014/15) de arroz, a produção média deverá ser 0,6% superior em relação à safra anterior, atingindo 12,2 milhões de toneladas. Esse aumento de produção ocorre devido à expectativa de aumento da produtividade, pois a área semeada deverá ser 0,8% inferior ao ciclo passado (CONAB, 2015).

No estado do Rio Grande do Sul, maior produtor nacional, a área cultivada com arroz na safra 2014/15 está estimada em 1,12 milhões de hectares, 0,1% menor que a cultivada na safra anterior. A estimativa de produção, para esta região, é de 8,17 milhões de toneladas, 0,7% maior que a safra anterior, o que representaria em torno de 67% da safra brasileira (CONAB, 2015).

Apesar do crescimento e dos bons níveis de produtividade de arroz, acredita-se que estes números sejam insuficientes para suprir o requerimento populacional no mundo. A demanda global por culturas agrícolas tem aumentado drasticamente e deve continuar ao longo de décadas, impulsionada tanto pelo crescimento populacional, o qual deve alcançar 9 bilhões de pessoas até a metade deste século, quanto pelo aumento da renda *per capita* (GODFRAY et al., 2010). Ao mesmo tempo está ocorrendo uma redução de áreas cultiváveis, e em consequência disso os produtores estão enfrentando maior competição por terra, água e energia, além da necessidade de combater os muitos efeitos negativos da produção de alimentos no ambiente (SCHMIDHUBER e TUBIELLO, 2007). Tanto o desmatamento, quanto o uso mais intensivo de terras agrícolas existentes poderiam contribuir para o aumento da produção agrícola necessária para atender tal demanda, mas os impactos ambientais e as implicações desses caminhos alternativos de expansão agrícola não são claros (GODFRAY et al., 2010).

O aumento da produtividade em terras agrícolas já existentes seria a melhor alternativa para satisfazer a crescente demanda populacional por grãos, pois evita o aumento da emissão de gases de efeito estufa e as perturbações em grandes escalas

dos ecossistemas existentes, associados ao uso de novas terras para produção (EDGERTON, 2009). De acordo com a FAO (2013), garantir a segurança alimentar e, ao mesmo tempo, contribuir para mitigar os efeitos das alterações climáticas e preservar as bases dos recursos naturais do ecossistema, requer a transição para um sistema de produção agrícola mais eficaz, que utilize os insumos naturais de forma mais eficiente e cujos rendimentos sejam mais estáveis e resilientes às alterações climáticas previstas em longo prazo. Para isso, a agricultura atual necessita de mudanças no uso de recursos naturais, como melhor gestão da terra, da água, dos nutrientes do solo e recursos genéticos. Este tipo de agricultura foi definida pela FAO, na Conferência sobre Agricultura, Segurança Alimentar e Mudanças Climáticas de 2010, como Agricultura Climática Inteligente.

Dentre os fatores ambientais, a salinidade do solo e da água de irrigação, seca, toxidez por ferro e temperaturas extremas, são os maiores limitantes para o aumento da produtividade do arroz. O estresse salino, causado principalmente pelo acúmulo de NaCl, é um dos principais estresses abióticos que limita o crescimento e produtividade das culturas, tanto em regiões irrigadas como em regiões de terras secas (HUSSAIN et al., 2010). Mais de 800 milhões de hectares de terra em todo o mundo são afetadas pela salinidade, o que corresponde a um valor de mais de 6% da área total de terras (RENGASAMY, 2002; FAO, 2008).

A Planície costeira do Rio Grande do Sul possui grandes áreas aptas para o cultivo de arroz irrigado, principalmente devido à grande disponibilidade de recursos hídricos e terreno favorável (CARMONA, 2010). No entanto, altas concentrações de NaCl no solo e na água, podem ser um fator limitante para o cultivo nesta região do Estado, onde a principal fonte de irrigação é a Laguna dos Patos que, por ter ligação com o Oceano Atlântico, sofre a sua influência, principalmente em épocas de baixa precipitação pluvial e elevada demanda, tanto atmosférica quanto das próprias lavouras de arroz do seu entorno. Os meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro são os mais quentes do ano e coincidem com o ciclo de irrigação dos arrozais (CARMONA, 2011).

Fisiologicamente, o estresse salino inibe o crescimento e desenvolvimento das plantas, reduzindo o potencial osmótico da solução do solo, restringindo a disponibilidade da água e/ou acumulando íons em excesso nos tecidos vegetais podendo ocasionar

toxicidade iônica, desequilíbrio nutricional, ou ambos (TESTER e DAVENPORT, 2003). Além disso, outras consequências da salinidade envolvem distúrbios na integridade das membranas, alterações nos níveis de reguladores de crescimento, nas atividades metabólicas, incluindo a fotossíntese, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (PANDA e KHAN, 2009), mudanças nas concentrações de carboidratos solúveis totais, fenóis totais, glicina betaína, prolina (LACERDA et al., 2001; ASHRAF e FOOLAD, 2007), clorofila (NETONO et al., 2004) e proteínas (LUNDE et al., 2007).

Assim como a salinidade pode ser agravada por alterações climáticas, que envolvem a falta de chuvas necessárias para a lixiviação do solo e consequentemente evitar a deposição excessiva de NaCl e outros sais, existem evidências de que eventos extremos de temperatura têm afetado diferentes partes do planeta e produzido enormes perdas econômicas (OLESEN et al., 2011). O arroz é uma cultura sensível às alterações de temperatura, e baixas temperaturas reduzem drasticamente a sua produtividade. Há cerca de 15 milhões de hectares de campos de arroz, em 24 países diferentes, sob a ameaça de temperaturas sub-ótimas (LOU et al., 2007).

Esse problema abrange também o Estado do Rio Grande do Sul, sendo mais grave nas regiões do Litoral Sul e da Campanha, as quais, historicamente, apresentam maiores frequências de temperaturas baixas, inferiores a 15°C durante a noite, em épocas que coincidem com o estádio reprodutivo do arroz. Uma estratégia para evitar que o estádio reprodutivo coincida com a ocorrência de temperaturas baixas (geralmente em fevereiro) é antecipar a época de semeadura da lavoura. Entretanto, com a deposição das sementes no solo ainda frio, a porcentagem e a velocidade da germinação são diminuídas, o período de emergência é prolongado e as plântulas têm seu desenvolvimento reduzido (FAGUNDES, 2010). Assim, para que a prática de semeadura antecipada seja viável, é necessária a utilização de cultivares que possam ser semeadas ainda com solo frio, ou seja, com tolerância a baixas temperaturas nas fases iniciais da planta (germinação/plântula).

Durante os estádios iniciais de crescimento do arroz, a ocorrência de estresse por frio inibe o estabelecimento de plântulas e, eventualmente, leva à maturação desuniforme da cultura (LOU et al., 2007). As baixas temperaturas também diminuem a taxa de crescimento vegetativo, e ondas de frio, mais significativas, podem causar esterilidade

do pólen e, assim, reduzir os rendimentos substancialmente (OLIVER et al., 2005). Do ponto de vista bioquímico, a tolerância ao frio é uma conjugação de respostas entre genes das rotas dos fitohormônios (etileno, ácido giberélico e ácido abscísico) (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006), fatores de transcrição (CBF, AREB, ABFs, BZip, ZincFinger, MYB/MYC) (GILMOUR et al., 1998; SAKUMA et al., 2002), desintoxicação das espécies reativas de oxigênio (enzimas SOD, CAT, APX), açúcares, aminoácidos (prolina), lipídeos de membrana e sistema de transdução de sinais (*Calcium/calmodulin Protein Kinase e Phospho-kinases*) além de outros genes (CHINNUSAMY et al., 2003; LEE et al., 2005; ITO et al., 2006; YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006).

Além dos estresses por sal e frio, a toxidez por ferro (Fe) também é um importante estresse abiótico que afeta a produtividade do arroz. Elevadas concentrações de Fe causam sérios distúrbios nutricionais em plantas, principalmente nos cultivos sob inundação (SOUSA et al., 2004), manejo este responsável por mais de 50% da produção brasileira deste cereal (MAPA, 2013). As perdas na produtividade de arroz, em função da toxidez por Fe, geralmente variam entre 15 e 20%, e nos casos mais graves, as perdas na colheita podem chegar a 100% (WINSLOW et al., 1989; AUDEBERT e SAHRAWAT, 2000).

Em condições de solo aerado, o Fe apresenta-se em sua forma oxidada trivalente (Fe^{+3}), pouco disponível para as plantas e quelado à matéria orgânica do solo (PONNAMPERUMA, 1972). Durante o alagamento, a concentração do íon ferroso (Fe^{+2}), forma disponível para as plantas, aumenta até atingir um valor máximo, com posterior decréscimo, sendo esta reação dependente do teor de matéria orgânica do solo, do pH e da concentração e reatividade dos óxidos de ferro (VAHL e SOUSA, 2004). Em ambiente anaeróbico, decorrente da inundação do solo, requerida no cultivo irrigado do arroz, microrganismos anaeróbicos passam a utilizar-se de compostos oxidados do solo, ocorrendo um decréscimo do pH devido ao acúmulo de CO_2, e o Fe^{+3} é reduzido, aumentando a disponibilidade do Fe^{2+} (SOUSA et al., 2004).

A expressão de sintomas de toxicidade de Fe em arroz requer a absorção excessiva de Fe^{+2} pelas raízes e sua translocação, via xilema, para as folhas. No interior das folhas, quantidades excessivas de Fe^{+2} causam uma elevada produção de radicais que podem danificar irreversivelmente os componentes estruturais celulares e levar a

uma acumulação de polifenóis oxidados (BECKER e ASCH, 2005). Um dos sintomas visuais típico, associado com este estresse, é o "bronzeamento" das folhas (HOWELER, 1973). Durante as fases vegetativa a toxicidade está associada à redução da altura da planta e acúmulo de matéria seca (ABU et al., 1989), com a parte aérea sendo mais afetada do que a biomassa radicular (FAGERIA, 1988). Tanto a formação quanto o número de afilhos produtivos, podem ser severamente reduzidos (CHEEMA et al., 1990).

A resposta das plantas às condições de salinidade, baixa temperatura e toxidez por Fe é um fenômeno extremamente complexo, envolvendo alterações morfológicas, de crescimento e desenvolvimento, além de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares. Assim, o conhecimento do transcriptoma de arroz, submetido a estes tipos de estresses, pode auxiliar a elucidar quais vias metabólicas são ativadas e quais são as principais respostas bioquímicas e fisiológicas das plantas em tais condições, permitindo a prospecção de marcadores moleculares que auxiliarão na seleção assistida e obtenção de cultivares com maiores níveis de tolerância a estas condições.

A tecnologia do RNA-seq permite caracterizar transcriptomas completos através do sequenciamento total do conteúdo de RNAs, extraídos de um tecido, em determinada condição. O uso desta tecnologia tem gerado uma grande quantidade de dados, tais como, diferenças em regiões 3'UTRs/5'UTRs, CDSs, regiões de *splicing* e *SNPs* (TRAPNELL et al., 2010). Também possibilita quantificar os níveis de expressão gênica, com resultados próximos aos obtidos em estudos de PCR quantitativo (Real Time), com elevados níveis de reprodutibilidade, tanto para as replicatas técnicas como para replicatas biológicas (CLOONAN et al., 2008).

A utilização desta técnica, na cultivar BRS Querência, caracterizada pela EMBRAPA como altamente produtiva, tolerante ao frio nos estádios iniciais, com bom nível de tolerância ao Fe e, classificada como moderadamente tolerante ao estresse salino (BENITEZ et al., 2011), permite identificar genes (transcritos) diferencialmente expressos, além de identificar os principais processos metabólicos afetados. Finalmente, esta estratégia permite identificar quais genes podem ser utilizados na seleção assistida para a tolerância ao estresse salino, frio e toxidez por ferro em plantas de arroz.

Referências bibliográficas

ABU, M. B.; TUCKER, E. S.; HARDING, S. S.; SESAY, J. S. Cultural pratices to reduce iron toxicity in rice. **International Rice Research Newsletter,** v. 14, n. 1, p. 1-19, 1989.

AUDEBERT A.; SAHRAWAT K. L. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition,** v. 23, n. 11-12, p. 1877-1885, 2000.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany,** v. 59, n. 2, p. 206 216, 2007.

BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice – conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, n. 4, p. 558-573, 2005.

BENITEZ, L. C.; RODRIGUES, I. C. S.; ARGE, L. W. P.; RIBEIRO, M. V.; BRAGA, E. J. B. Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 409-416, 2011.

CARMONA, F. C.; ANGHINONI, I.; HOLZSCHUHI, M. J.; ANDRIGHETTI, M. H. Cation dynamics in soils with different salinity levels growing irrigated rice. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v. 34, n. 6, p.1851-1863, 2010.

CARMONA, Fernando de Campos. **Salinidade da água e do solo e sua influência sobre o arroz irrigado**. 2011. 113 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CHEEMA, S. S.; CHAUDHARY, U.; TAKKAR, P. N.; SHARMA, B. D. Effect of dates of transplanting on uptake of micronutrients by rice cultivars of different growth stages. **Journal of Research Punjab Agricultural University**, v. 27, n. 2, p. 199-206, 1990.

CHINNUSAMY, V.; OHTA, M.; KANRAR, S.; LEE, B. H.; HONG, X.; AGARWAL, M.; ZHU, J. K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Genes & Development**, v. 17, n. 8, p. 1043-1054, 2003.

CLOONAN, N.; FORREST, A. R.; KOLLE, G.; GARDINER, B. B.; FAULKNER, G. J.; BROWN, M. K.; TAYLOR, D. F.; STEPTOE, A. L.; WANI, S.; BETHEL, G.; ROBERTSON, A. J.; PERKINS, A. C.; BRUCE, S. J.; LEE, C. C.; RANADE, S. S.; PECKHAM, H. E.; MANNING, J. M.; MCKERNAN, K. J.; GRIMMOND, S. M. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nature Methods,** v. 5, n. 7, p. 613-619, 2008.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/. 2015. Acesso em 7 de janeiro de 2015.

EDGERTON, M. D. Increasing Crop Productivity to Meet Global Needs for Feed, Food, and Fuel. **Plant Physiology,** v. 149, p. 7-13, 2009.

FAGUNDES, P. R.; MAGALHÃES-JÚNIOR, A.M.; STEINMETZ, S. Tolerância de genótipos de arroz irrigado ao frio nos estádios de germinação e emergência. In: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 118, 2010.19p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Land and Plant Nutrition Management Service. http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush. 2008

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org/. 2013.

FAGERIA, N. K.; CARVALHO, G. D.; SANTOS, A. B.; FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M. Chemistry of Lowland Rice Soils and Nutrient Availability. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.42, n. 16, p.1913-1933, 2011.

GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; STOCKINGER, E. J.; SALAZAR, M. P.; HOUGHTON, J. M.; THOMASHOW, M. F. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold induced COR gene expression. **Plant Journal**, v.16, n.4, p.433-42, 1998.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science,** v. 327, n. 5967, p. 812-818, 2010.

HOWELER, R. H. Iron induced oranging disease of rice in relation to physico-chemical changes in a flooded oxisol. **Soil Science Society of America Proceedings,** v. 37, p. 898-903, 1973.

HUSSAIN, K.; NISAR, M. F.; MAJEED, A.; NAWAZ, K.; BHATTI, K. H.; AFGHAN, S.; SHAHAZAD, A.; ZIA-UL-HUSSNIAN, S. What molecular mechanism is adapted by plants during salt stress tolerance? **African Journal of Biotechnology,** v. 9, n. 4, p. 416-422, 2010.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice DREB1/CBF type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. **Plant Cell Physiology**, v. 47, n. 1, p. 141-153, 2006.

LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.; RUIZ, H. A. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 270-284, 2001.

LEE, B. H.; HENDERSON, D. A.; ZHU, J. K. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. **Plant Cell**, v. 17, p. 11, p. 3155-3175, 2005.

LOU, Q.; CHEN, L.; SUN, Z.; XING, Y.; LI, J.; XU, X.; MEI, H.; LUO, L. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica,** v. 158, n. 1-2, p. 87-94, 2007.

LUNDE, C.; DREW, D. P.; JACOBS, A. K.; TESTER, M. Exclusion of Na^+ via sodium ATPase (PpENA1) ensures normal growth of *Physcomitrella patens* under moderate salt stress. **Plant Physiology**, v. 144, n. 4, p. 1786-1796, 2007.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>. Acesso em 09 de janeiro de 2015.

NETONO, G. W.; ONYANGO, J. C.; BECK, E. Sorghum and salinity: gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. **Crop Science**, v. 44, n. 3, p. 806-811, 2004.

OLESEN, J. E.; TRNKA, M.; KERSEBAUM, K. C.; SKJELVÅG, A. O.; SEGUIN, B.; PELTONEN-SAINIO, P.; ROSSI, F.;KOZYRA, J.;MICALE, F. Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. **European Journal of Agronomy,** v. 34, p. 239-262, 2011.

OLIVER, S. N.; VAN DONGEN, J. T.; ALFRED, S. C.; MAMUN, E. A.; ZHAO, X.; SAINI, H. S.; FERNANDES, S. F.; BLANCHARD, C. L.; SUTTON, B. G.; GEIGENBERGER, P.; DENNIS, E. S.; DOLFERUS, R. Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene *OSINV4* is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. **Plant, Cell & Environment,** v. 28, n. 12, p. 1534-1551, 2005.

PANDA, S. K.; KHAN, M. H. G. Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term Salinity Stress and its Recovery. **Journal Agronomy Crop Science,** v. 195, n. 6, p. 442-454, 2009.

PONNAMPERUMA, F. N. The chemistry of submerged soils. **Advances in Agronomy,** v. 24, p. 29-96, 1972.

RENGASAMY, P. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. **Australian Journal of Experimental Agriculture,** v. 42, n. 3, p. 351 – 361, 2002.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 290, n. 3, p. 998-1009, 2002.

SCHMIDHUBER, J.; TUBIELLO, F. N. Global food security under climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 104, n. 50, p.19703-19708, 2007.

SOUSA, R. O.; GOMES, A. da S.; VAHL, L. C. Toxidez por ferro em arroz irrigado. In: GOMES E MAGALHÃES JR (eds.). **Arroz Irrigado no sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p.305-334.

TESTER, M.; DEVENPORT, R. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. **Annals of Botany,** v. 91, n. 5, p.503-527, 2003.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M. J.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology,** v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010.

VAHL, L. C.; SOUSA, R. O. Aspectos físico-químicos de solos alagados. In: **Arroz Irrigado no Sul do Brasil, Editores técnicos** - GOMES, A. S., MAGALHÃES JR., Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnologia, 2004, p.97-118.

WINSLOW, M. D.; YAMAUCHI, M.; ALLURI, K.; MASAJO, T. M. Reducing Iron Toxicity in Rice with Resistant Genotype and Ridge Planting. **Agronomy Journal,** v. 81 v. 3, p. 458-460, 1989.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology,** v. 57, p.781-803, 2006.

Artigo 1 – BMC Plant Biology

(ISSN: 1471-2229)

Transcriptômica comparativa de plantas de arroz submetidas a estresses abióticos revela diferentes graus de complexidade de rede regulatória

Resumo

Dentre os principais fatores limitantes da produtividade do arroz (*Oryza sativa* L.) destacam-se a salinidade, toxidez por ferro e baixas temperaturas. A elucidação das redes regulatórias e dos genes envolvidos em respostas a estes estresses é de fundamental importância para compreender os mecanismos que conferem tolerância e para o desenvolvimento de cultivares adaptadas a estas condições. Neste trabalho, foi utilizada a técnica de RNA-Seq para comparar o perfil transcricional em folhas de arroz (cv. Querência), em estádio V3, submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas. Um intervalo entre 41 - 51 milhões de *reads* foram submetidas ao alinhamento, sendo que deste total um intervalo entre 88,47 - 89,21% foram mapeadas no genoma de referência. Foram observados 5.506 genes diferencialmente expressos (DEGs) para o estresse por frio, 1.808 para o sal e 630 para o ferro, sendo que 330 DEGs foram comuns aos três estresses. A anotação funcional através do software MapMan demonstrou que o estresse por frio se destaca por ser a condição estressante que promoveu maiores alterações no metabolismo em geral e a análise de enriquecimento de termos de GOs sobre-representados demonstra que a maioria estão situados em plastídios, ribossomos e cloroplastos. O estresse salino apresentou uma rede de interação de termos GOs sobre-representados mais complexa que os demais estresses. O presente estudo demonstrou que o estresse por baixa temperatura apresenta um maior número de genes diferencialmente expressos e que há uma maior relação entre o estresse salino e toxidez por ferro. Em nível molecular a fotossíntese parece ser o principal processo fisiológico afetado nos três estresses.

Palavras-chave: estresse por frio, estresse por ferro, estresse salino, genes diferencialmente expressos, RNA-seq, *Oryza sativa* L.

Abstract

Among the main limiting factors of rice (*Oryza sativa* L.) productivity salinity, toxicity by iron and low temperatures are included. The elucidation of regulatory networks and the genes involved in responses to these stresses is extremely important for understanding the mechanisms that establish tolerance, as well as, for the development of adapted cultivars to these conditions. In this study, we have used RNA-Seq technique to compare the transcriptional profile on rice leaves (cv. Querência), in V3 stage, they went under to stresses by cold, iron and salt during 24 hours. A range from 41 to 51 million reads was submitted to alignment, in which a total range from 88.47 to 89.21% has been mapped in the reference genome. 5,506 differentially expressed genes were observed (DEGs) for cold stress, 1,808 for salt and 630 for the iron stress, 330 of them were similar to the three DEGs stresses. Functional annotation through software MapMan has demonstrated that stress by cold stands out for being the stressful condition that usually has promoted greater changes in the metabolism and enrichment analysis of GOs terms over-represented demonstrating that most of them are situated in plastids, ribosome and chloroplasts. The saline stress introduced a network of GOs terms interaction over-represented that is more complex than the other stresses. The present study has demonstrated that the low temperature stress has a greater number of differentially expressed genes and that there is a greater relationship between the salt stress and toxicity by iron. Molecular-level photosynthesis seems to be the main physiological process affected among the three stresses.

Keywords: cold stress, iron stress, saline stress, differentially expressed genes, RNA-seq, *Oryza sativa* L.

Introdução

Diversos fatores ambientais, como salinidade, toxidez por íons e temperaturas extremas afetam negativamente o crescimento e o desenvolvimento de plantas, levando a perdas na produtividade [1]. Estima-se que mais de 90% das terras cultiváveis do mundo são afetadas por fatores de estresse abiótico [2].

Dentre os principais estresses abióticos limitantes da produtividade do arroz (*Oryza sativa* L.) destaca-se a salinidade, tanto em ambientes irrigados como em ambientes secos [3,4,5]. Dos 230 milhões de hectares de terras irrigadas, 45 milhões (20%) são afetados pela salinidade [6]. Outro fator limitante para a produção de arroz em solos alagados é a toxidez por Ferro, sendo considerada a principal desordem nutricional para esta cultura [7]. Esta toxidez ocorre em ambientes encharcados, sob condições de anaerobiose e baixo pH, no qual o Fe passa da forma insolúvel Fe^{+3} para Fe^{+2} solúvel, podendo ser absorvido rapidamente pelas raízes, e quando em concentrações intracelulares excessivas causa toxicidade pela elevada produção de espécies reativas de oxigênio, podendo assim afetar componentes de estrutura celular e processos fisiológicos [8,9]. Além disso, por ter origem em áreas tropicais e subtropicais, o arroz é uma planta sensível ao frio, onde baixas temperaturas reduzem drasticamente a sua distribuição geográfica e produtividade. Cerca de 15 milhões de hectares de campos de arroz em 24 países diferentes estão sujeitos às baixas temperaturas [10,11].

A tolerância ou sensibilidade a estes fatores abióticos é um fenômeno complexo que envolve respostas a níveis moleculares, celulares, fisiológicos e bioquímicos. No entanto, muitas vezes a planta não é afetada por um fator estressante isolado, mas sim por mais de um estresse. Vários desses estresses abióticos resultam em efeitos gerais ou específicos no crescimento e desenvolvimento da planta [12,13].

Concentrações elevadas de NaCl, inicialmente, causam estresse osmótico, reduzindo a disponibilidade de água para as plantas. Além disso, o sódio compete com outros cátions e pode afetar a nutrição das plantas e a homeostase de íons [4,14,15]. Plantas com altos teores de ferro também sofrem de distúrbios nutricionais e são caracterizadas pelo crescimento atrofiado e sistema radicular pouco desenvolvido [16,17]. Baixas temperaturas também podem causar estresse osmótico, além de efeitos diretos no metabolismo [18,19]. Portanto, estes estresses, apesar de possuírem alguns

fatores específicos, compartilham de algumas generalidades.

A elucidação das redes regulatórias e dos genes envolvidos em respostas ao estresse abiótico é de fundamental importância para compreender os mecanismos que conferem tolerância e para o desenvolvimento de cultivares adaptadas a essas condições. Recentemente, com o avanço dos sequenciadores de última geração (NGS), a técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) tornou-se uma ferramenta útil para a análise de perfis transcricionais, fornecendo com maior precisão uma visão global dos genes relacionados a respostas aos estresses abióticos [20].

Diversos estudos utilizando a técnica de RNA-Seq descrevem os perfis transcricionais diferenciais de arroz sobre estresse salino [21] estresse por fosfato [22], plantas com reticulo endoplasmático em condição de estresse [23] e estresse por excesso de Cádmio [24]. Entretanto, nenhum estudo comparando o perfil transcricional de arroz em três diferentes estresses abióticos é relatado.

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de RNA-Seq para analisar o perfil transcricional de arroz submetido ao estresse por frio, ferro e sal, em que se pode elucidar os genes diferencialmente expressos para os três estresses. Duas estratégias, análise de enriquecimento de ontologia genica (*GO Enrichment Analysis*) e MapMan foram utilizadas para demonstrar quais os principais processos e rotas metabólicas sofreram alterações em resposta aos estresses.

Material e Métodos

Material Vegetal

Sementes de arroz da cv. BRS Querência foram germinadas em câmara de crescimento do tipo BOD, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C, e mantidas por um período de sete dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para bandejas plásticas (3L) contendo areia previamente lavada com água destilada e mantidas em casa de vegetação com temperatura de 26±2°C, umidade relativa do ar de aproximadamente 60%, e irrigação manual e alternada (intervalos de dois dias) com solução nutritiva de Yoshida [25] e água. A escolha da cv. BRS Querência se deve ao fato dela ser caracterizada pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) como uma cultivar altamente produtiva e tolerante ao estresse por ferro,

além de ser caracterizada como moderadamente tolerante ao estresse salino [26].

Ao atingirem o estádio V3 as plantas foram submetidas a três diferentes estresses, separadamente, durante 24 horas. Para o estresse salino e estresse por toxidez de Fe^{+2}, as plantas foram irrigadas com solução de Yoshida adicionada de 150 mM de NaCl, conforme Singh et al. [27], e 300 mg L^{-1} Fe^{+2} conforme Elec et al. [28], respectivamente. Para o estresse por baixa temperatura, as plantas foram irrigadas com solução de Yoshida padrão e mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD com temperatura de 13°C e fotoperíodo de 16 horas, conforme Cui et al. [29]. O tratamento controle foi mantido em casa de vegetação e irrigado com solução de Yoshida padrão. O delineamento experimental foi completamente ao acaso, com três repetições por tratamento, onde cada repetição foi constituída de duas bandejas com 50 plantas em cada, totalizando 100 plantas por repetição.

Tecidos foliares de um bulk de 50 plantas foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer à -80°C para posterior extração de RNA e análises (Figura 1). As plantas controle foram coletadas ao mesmo tempo que as plantas estressadas.

Preparo do cDNA e sequenciamento

O RNA total foi extraído, a partir de 100 mg de folhas (bulk de 50 plantas), utilizando Plant RNA Reagent Purelink® (Invitrogen*TM*). Sua integridade e qualidade foi verificada por espectrofotômetro NanoDrop ND-1000® (GE Healthcare*TM*) e a eletroforese realizada em gel de agarose 1%. As bibliotecas foram preparadas por meio do kit TruSeq RNA Sample Preparation® V 2 (Illumina*TM*), segundo recomendações do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi avaliada com o equipamento Agilent 2100 BioAnalyzer® (Agilent Technologies*TM*) utilizando o kit Agilent DNA 1000® (Agilent*TM*). O sequenciamento das bibliotecas foi do tipo *paired-end* 2x100pb realizado na plataforma HiSeq 2500® (Illumina*TM*).

Análise da qualidade e limpeza dos *reads*

Para a análise e visualização da qualidade das *reads*, foi utilizado o programa FastQC Ver. 0.1.1.2 [30]. Após, o programa Trimmomatic Ver. 0.32 [31] foi utilizado para

a remoção das bases com baixa qualidade e dos adaptadores de cada biblioteca. Os parâmetros para essa etapa foram: PE, indicando que as sequências estão no formato *paired-end*; *ILLUMINACLIP* para retirar as possíveis sequências de adaptadores; SLIDINGWINDOW:4:25, para retirar as bases de qualidade inferior a 25 dentro de uma janela de 4 bases; *LEADING*:10 e *TRAILING*:10, para retirar bases com qualidade inferior a 10, de ambos os lados dos *reads*; e MINLEN:90, para manter as *reads* com o mínimo de 90 bases, descartando os que apresentaram tamanho inferior a isto após a limpeza.

Identificação de genes diferencialmente expressos

As *reads* foram mapeadas contra o genoma de referência de *Oryza sativa* cv. Nipponbare (IRGSP build 1.0) obtido a partir do The Rice Annotation Project Database (RAP-DB: http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html) [32], através do software TopHat Ver. 2.0.11 [33], que utiliza o software Bowtie Ver. 0.12.7 [34] para o mapeamento das *reads*, acrescentado de um algoritmo para detecção de *splicing alternativo*. O software HTseq Ver. 0.5.3 [35] foi utilizado para contagem das *reads*.

A identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada utilizando o programa R v3.1.0 [36] com o pacote edgeR Ver. 3.8.5 [37] obtido do repositório Bioconductor [38]. Os níveis de expressão foram normalizados pelo método RPKM (*Reads per kilobase of transcript per million reads mapped*), sendo considerados diferencialmente expressos os genes com valores de $p < 0,01$ pelo teste exato de Fisher.

A relação direta entre os estresses foi mensurada através de uma análise de compartilhamento de genes expressos e DEGs, e representada graficamente em um diagrama de Venn. Além da análise de compartilhamento foi realizada a similaridade entre os estresses com base nos DEGs utilizando o coeficiente de similaridade *Simple Matching* utilizando o software R v3.1.0 [36].

Os genes diferencialmente expressos foram submetidos a análise de enriquecimento utilizando o programa BLAST2GO Ver. 2.7.2, onde após a anotação e ontologia genica, os termos de GOs sobre-representados foram identificadas utilizando o teste exato de Fisher ($p < 0,01$) corrigido pelo método de FDR (*false discovery rate*) com $p < 0,05$ [39]. O software MapMan Ver. 3.5.1.R2 [40] foi utilizado para visualizar mudanças gerais no metabolismo relacionadas aos estresses. E a ferramenta REViGO

[41] foi utilizada para a visualização dos resultados de processos biológicos na forma de uma rede de interação de GOs (somente genes *up-regulated*), enquanto a função molecular e componentes celulares foram apresentados na forma de *heatmap*.

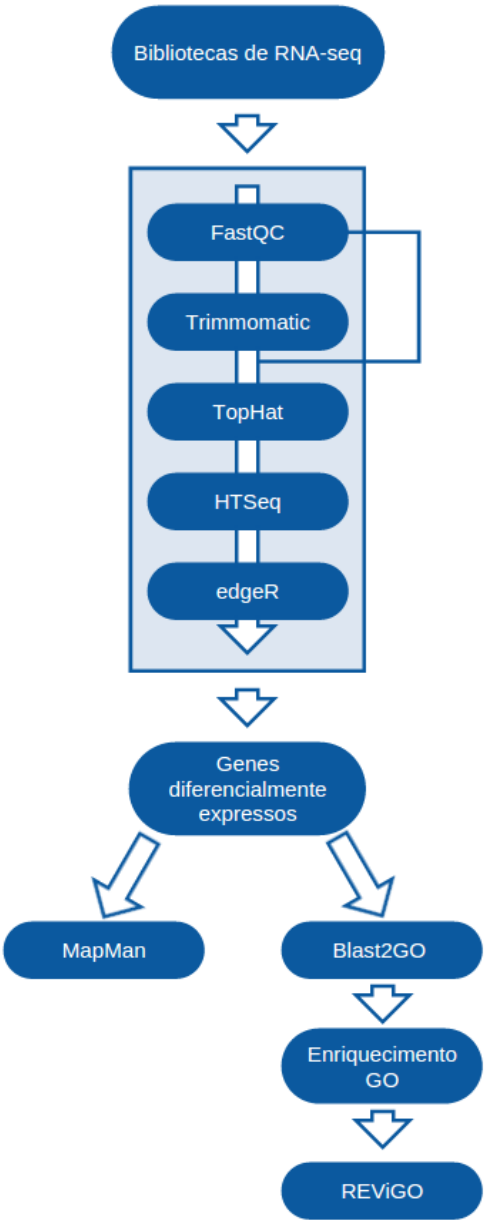


Figura 1 Fluxograma da metodologia empregada para o tratamento das bibliotecas de RNA-Seq.

Resultados

Sequenciamento de mRNA e alinhamento contra genoma de referência

A última tecnologia de sequenciamento (*Next Generation Sequencing* - NGS) de ácidos nucléicos tem possibilitado o aumento exponencial de dados nos bancos de dados genômicos e transcriptômicos. Em transcriptômica, a NGS possibilita obter dados com maior acurácia para inferir sobre expressão de determinados genes, quando comparada com a tecnologia de microarranjos. A forma de quantificar expressão pela metodologia de RNA-seq baseia-se na contagem de *reads* ou fragmentos por *locus*, e a do microarranjos em quantificar a quimioluminescência de sondas específicas presentes em um *chip*. Por ter como requisito a existência de *chips* específicos para a espécie alvo de estudo, a tecnologia de microarranjos se torna restrita a *chips* disponíveis, e a quantificação de quimioluminescência pode gerar erros e enviesar os resultados. Assim, devido às limitações da tecnologia de microarranjos, foi empregado, no presente trabalho, o sequenciamento de RNA (RNA-seq) para elucidar os genes expressos e genes diferencialmente expressos (DEGs) no estresse por frio, ferro e sal, na cultivar de arroz BRS Querência, em estádio V3, com cada tratamento constituído por três repetições biológicas.

Na Tabela 1 estão presentes os resultados globais de alinhamento de *reads* por tratamento contra o genoma de referência do arroz cv. Nipponbare. O alinhamento foi realizado após a remoção dos adaptadores. Os resultados são oriundos das bibliotecas selecionadas com base na proximidade de agrupamento de cada componente principal do logFC (Material Suplementar 1). Bibliotecas discrepantes foram excluídas para evitar vieses. Um total de 41M - 51M *reads* foram submetidas ao alinhamento, sendo que deste total 88,47 - 89,21% foram mapeados e de 6,60 - 25,27% do total de *reads* apresentaram múltiplos alinhamentos. O parâmetro de multi-alinhamento é um significante impedimento em estudos transcriptômicos que empregam metodologia de sequenciamento de *reads* curtas, pois é uma das principais fontes de erros e redução de cobertura nestes estudos. Este parâmetro é influenciado tanto pelo comprimento quanto pela complexidade das *reads*, portanto, para reduzir prováveis erros, tais *reads* (multi-alinhadas) foram excluídas das análises posteriores.

Tabela 1 Resultados totais do alinhamento de *reads* de plantas de arroz (cv. BRS Querência) submetidas ao estresse por frio, ferro e sal durante 24h, contra o genoma de referência (cv. Nipponbare)

Condição	*Input*	Mapeados	Mapeados %	Múltiplos Alinhamentos	Múltiplos Alinhamentos %
Controle	46.291.402	41.295.053	89,21	9.460.112	22,91
Frio	47.724.928	42.483.780	89,02	2.805.725	6,60
Ferro	41.268.406	36.509.050	88,47	9.225.840	25,27
Sal	51.365.782	45.688.598	88,95	4.355.103	9,53

Análise global de expressão gênica

A Figura 2 apresenta os resultados do total de genes expressos, dos DEGs para cada estresse (gráfico de barras), e os DEGs exclusivos e em comum entre dois ou mais estresses (diagramas de Venn).

Os estresses por sal e frio apresentaram número de genes expressos muito similares, aproximadamente 23 mil, e o estresse por ferro apresentou menor número (Figura 2A). Do total de genes expressos, 20.400 genes foram comuns aos três estresses, 990 foram comuns aos estresses por frio e sal, 753 entre ferro e sal, e 572 entre frio e ferro.

Do total de genes expressos em cada estresse, o frio foi o estresse que apresentou o maior número de DEGs com 5.506 (23,4%), seguido por sal com 1.808 (7,8%) e ferro com 630 (2,8%) (Figura 2B). O maior número de DEGs em comum a dois estresses ocorreu entre o estresse por baixa temperatura e salino, com 920 genes, seguido pelo estresse por sal e ferro, com 120 genes, e toxidez por ferro e frio, com 104 genes. O estresse por baixa temperatura foi o que apresentou mais DEGs exclusivos, com 4.152 genes e os estresses salino e por ferro apresentaram números menores, com 437 e 73 genes, respectivamente. Foram identificados 330 DEGs comuns aos três estresses (Figura 2 B1).

Ao analisarmos o diagrama de Venn com os DEGs regulados positivamente ou negativamente (*up*- e *down-regulated*) esses números variam do total de DEGs, pois um

gene que é comum a dois estresses pode apresentar uma regulação distinta em cada condição, passando a ser um gene exclusivo. O maior número de DEGs *up* e *down-regulated* em comum se apresentou entre os estresses de sal e frio. Entretanto, ao realizarmos uma análise de relação entre os estresses pelo coeficiente de *Simple Matching*, os estresses por sal e ferro apresentaram uma relação maior entre eles do que com o estresse por frio, isso se deve ao fato de que dos poucos DEGs encontrados no estresse por Fe, grande parte estão em comum com o estresse salino (Material Suplementar 2). O estresse por baixa temperatura nesta análise apresentou 2.467 DEGs regulados negativamente e 2.185 regulados positivamente exclusivos para esta condição. Para o estresse salino, 298 genes apresentaram regulação negativa e 440 regulação positiva, sendo o estresse por ferro o que apresentou menores números de genes regulados negativamente (67) e regulados positivamente (69). Apenas 73 DEGs apresentaram regulação negativa e 114 com regulação positiva para os três estresses (Figura 2 B1).

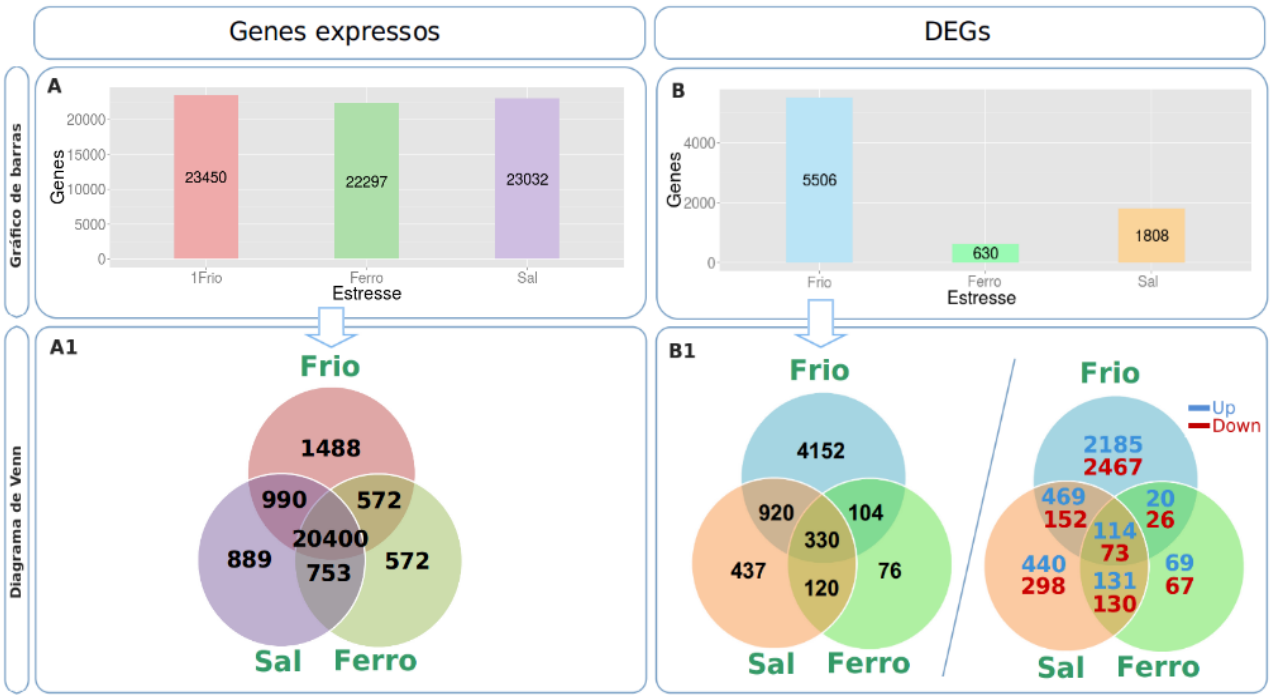


Figura 2 Sumário de todos genes expressos em folhas de arroz sob estresses por frio, ferro e sal, e dos genes diferencialmente expressos pelo valor de p < 0,01. A - Gráfico de barras para resultados globais de expressão. A1 - Diagrama de Venn para resultados globais de expressão. B - Gráfico de barras para resultados dos genes diferencialmente expressos. B1 - Diagrama de Venn para resultados de genes diferencialmente expressos e diagrama com filtro para genes *up*- e *down-regulated*.

Devido ao grande número de informação em relação ao número de DEGs, optou-se em construir uma tabela de sumarização categorizando o conjunto de DEGs em intervalos de logFC (Tabela 2). O intervalo de logFC ±1,0 ~ ±1,99 para o estresse por frio foi o que apresentou o maior número de genes diferencialmente expressos. Entretanto o mesmo não ocorreu para os estresses por toxidez por ferro e sal, os quais apresentaram o intervalo de 0 ~ ±0,99 como o mais representativo entre os diferentes intervalos analisados. O estresse por toxidez de Fe foi o único que não apresentou DEGs com LogFC menor que -3,0, e apresentou apenas um gene com valor maior que 3,0.

Tabela 2 Categorização dos genes diferencialmente expressos em plantas de arroz (cv. BRS Querência), submetidas a estresse por frio, ferro e sal durante 24h de acordo com o valor de Log 2FoldChange (LogFC)

LogFC	Frio	Ferro	Sal
0 – 0,99	920	313	893
1,0 – 1,99	1226	18	254
2,0 – 2,99	479	2	4
3,0 – ∞	163	1	3
0 – (-0,99)	887	254	501
-1,0 – (-1,99)	1400	41	138
-2,0 – (-2,99)	344	1	11
-3,0 – (-∞)	87	0	3
Variação	-5,6 – 6,85	-2,67 – 3,59	-3,62 – 3,59

Os DEGs que se apresentaram em comum aos três estresses (187) apresentam diferentes níveis de regulação de sua expressão, pois os valores de expressão de cada gene diferiram entre si nos diferentes estresses. Entretanto, ao analisar-se o *heatmap*, o padrão de expressão entre o estresse salino e por ferro apresentam maiores semelhanças quando comparados ao frio, o qual apresentou valores de expressão gênica

maiores, corroborando assim os resultados da análise de similaridade pelo coeficiente de *Simples Matching*. Tais genes estão relacionados com processos celulares essenciais ao desenvolvimento celular e manutenção do metabolismo, ou seja, genes de função basal (Figura 3).

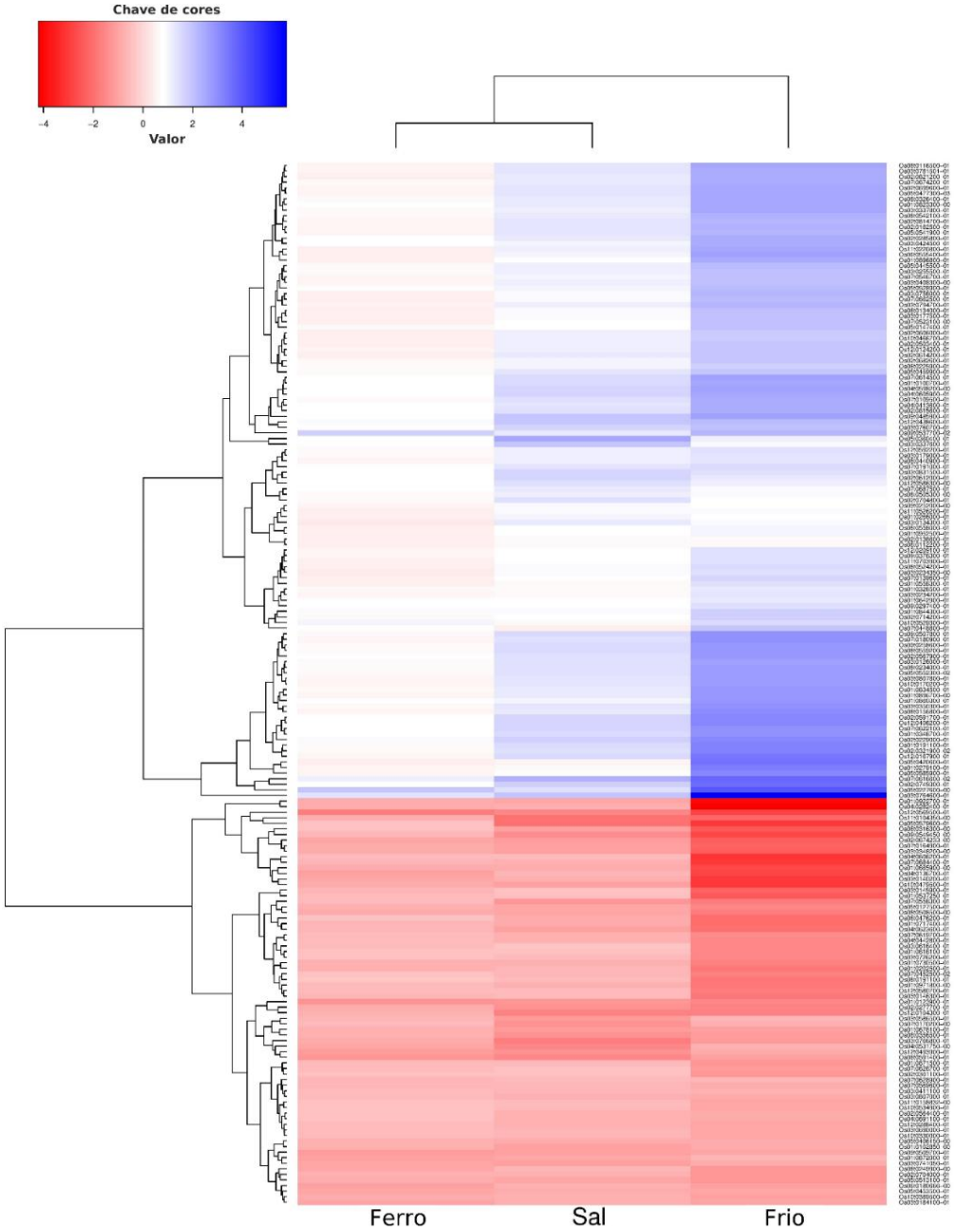


Figura 3 *Heatmap* dos genes diferencialmente expressos em comum aos três estresses.

Anotação funcional de DEGs

Para uma melhor compreensão de alterações no metabolismo em cada estresse, foi realizada diferentes anotações funcionais sobre os genes diferencialmente expressos.

A anotação funcional através do software MapMan possibilitou ter uma visão geral sobre o metabolismo alterado nos três diferentes estresses. No estresse por frio (Figura 4) pode-se visualizar 567 pontos de um total de 5317 DEGs mapeados (10,66%), 90 pontos visualizados de um total de 598 mapeados (15,05%) no estresse por toxidez de ferro (Figura 5A) e 222 pontos visualizados de 1774 mapeados (12,51%) no estresse salino (Figura 5B). Ao visualizar-se os diferentes processos metabólicos alterados em cada estresse pelo MapMan, o frio se destaca por ser a condição estressante que promoveu maiores alterações no metabolismo em geral. Os principais processos alterados nos três estresses foram reações luminosas, fotorrespiração e metabolismo de moléculas tetrapirrólicas. Além disso, no estresse por frio houve alterações no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA), açúcares, lipídeos e metabolismo secundário.

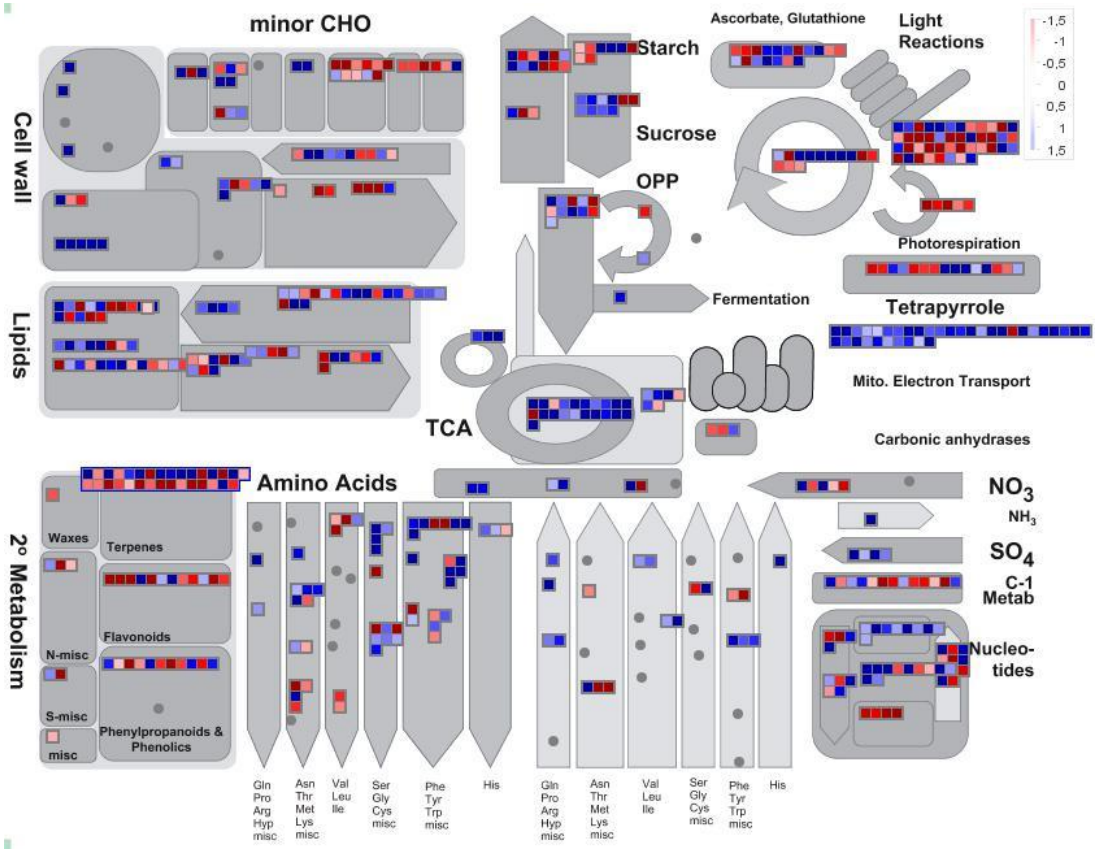


Figura 4 Visão geral do metabolismo alterado através do software Mapman para o estresse por frio.

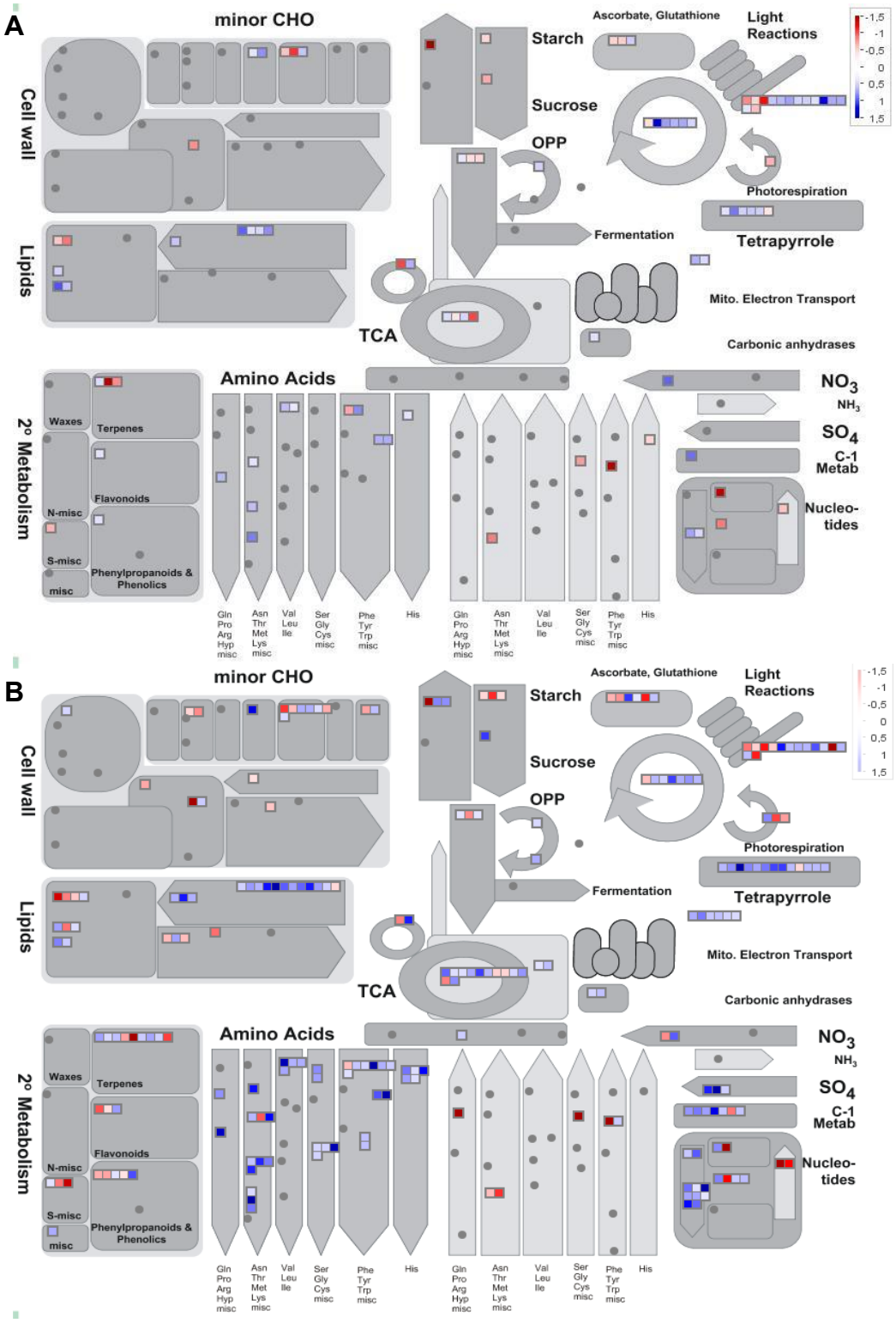


Figura 5 Visão geral do metabolismo alterado através do software Mapman para os estresses por ferro (A) e sal (B).

Apesar do software Mapman possibilitar uma rápida visualização e detalhamento de conjuntos de transcritos em determinadas espécies, esta ferramenta não se faz tão eficaz na interpretação de largos conjuntos de dados, ou sob conjuntos de genes que apresentem anotação mais recente. Assim a anotação funcional via anotação de termos GOs possibilita uma elucidação dos diferentes processos celulares alterados com maior precisão.

Parte dos resultados da análise enriquecimento de termos GOs sobre-representados das três classes ontológicas estão demonstrados em forma de *heatmap* na Figura 6, com exceção para genes *up*-regulados da classe de processos biológicos, o qual apresentou um número muito superior de GOs. Os principais termos GOs sobre-representados das três classes ontológicas para os três estresses estão situados em regiões como: plastídio (GO:0009536), ribossomos (GO:0003735, GO:0005840, GO:0030529,), citosol (GO:0005829, GO:0031410, GO:0016023), membrana e vesícula (GO:0031980, GO:0031982) e cloroplasto (GO:0009507, GO:0044434, GO:0009570).

Figura 6 *Heatmap* dos resultados na análise de enriquecimento dos termos GOs sobre-representados. Nota: exceto para processos biológicos *up-regulated*.

Os termos GOs relacionados a Processos Biológicos para os DEGs regulados positivamente, foram representados na forma de uma rede de interação entre GOs, pela ferramenta REViGO. Apesar do número mais expressivo de DEGs para o estresse por

frio, o estresse salino apresentou uma rede de interação de termos GOs sobre-representados mais complexa (Figura 7A), onde seus principais processos estão relacionados com: expressão gênica, tradução, biossíntese celular, metabolismo de RNA, biossíntese de substâncias orgânicas, biogêneses de ribossomos, biogêneses ou organização de componentes celulares, metabolismo de substâncias orgânicas, metabolismo primário, processos celulares, biossíntese, metabolismo e metabolismo celular. A seguir ao estresse por sal, a baixa temperatura (Figura 7B) foi o estresse que apresentou maior número de termos GOs sobre-representados, entretanto a diferença para o estresse por ferro é pequena (Figura 7C).

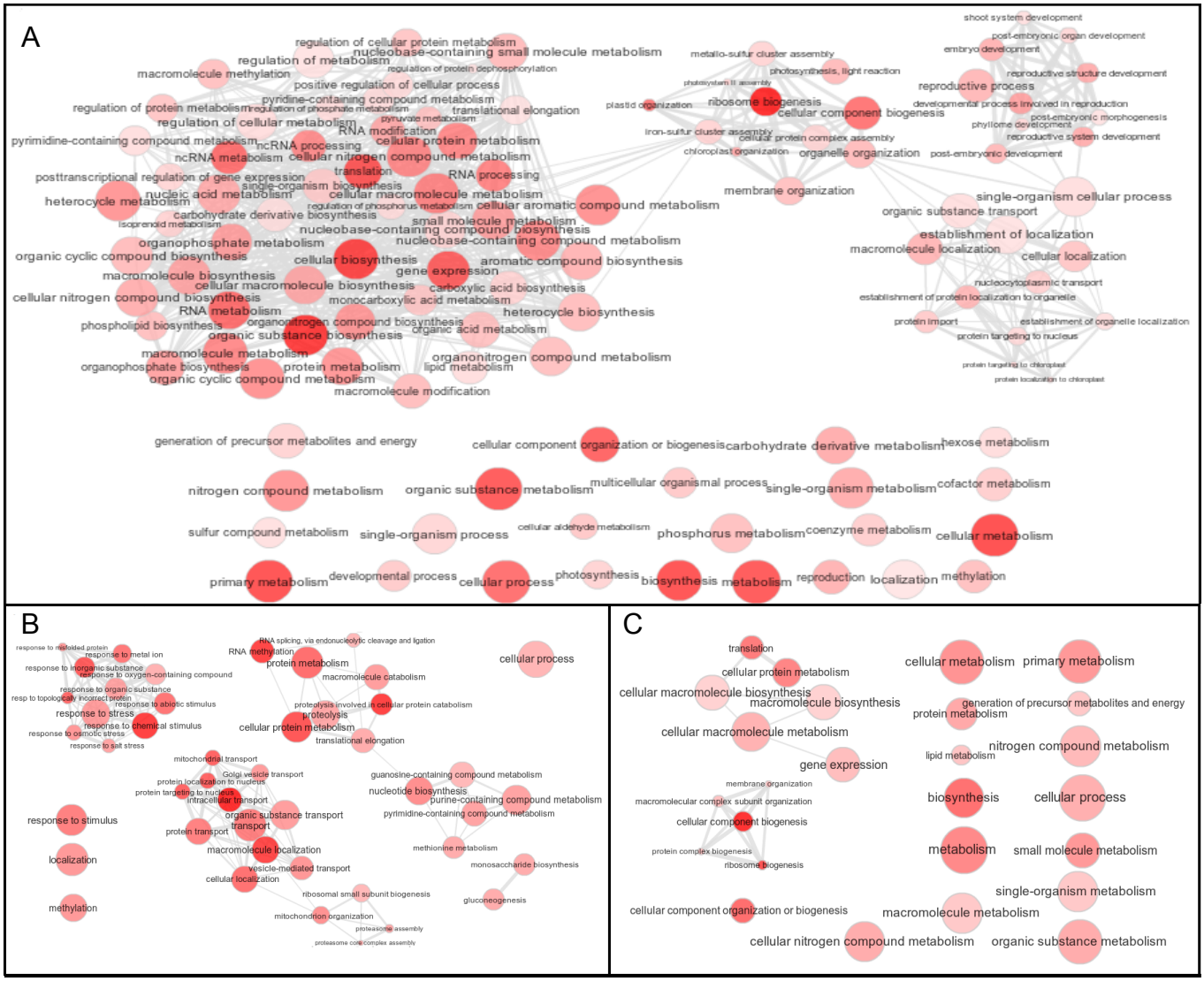


Figura 7 Representação gráfica das interações dos termos GOs para processos biológicos *Up-regulated*. A - estresse salino, B - Frio, C - Ferro.

Discussão

Com a metodologia de sequenciamento de RNA foi possível elucidar o perfil transcricional da cultivar de arroz BRS Querência submetida aos estresses de frio, ferro e sal em um período de 24 horas no estádio V3. Além disto, foi possível comparar os perfis e verificar as principais diferenças existentes entre os estresses. Os resultados de compartilhamento de genes expressos indicam que há uma maior relação entre os estresses de ferro e sal, e o de frio apresentando um alto número de genes expressos exclusivos. Entretanto, os resultados de termos GOs sobre-representados indicam uma maior complexidade de regulação para o estresse salino. Em trabalho semelhante de transcriptômica comparando diferentes tipos de estresse em arroz pela técnica de microarranjos, Rabbani et al. [42] relatam um maior número de genes diferencialmente expressos para estresse por seca e NaCl, seguido de estresse por baixa temperatura. Porém, para *Arabdopsis thaliana* e batata (*Solanum tuberosum* L.), autores relatam um maior número de genes expressos em estresse por frio, demonstrando que a resposta está intimamente relacionada com a espécie e genótipo, e sua tolerância em específico a um estresse [43,44]. No presente estudo, o estresse por frio apresentou um maior número de DEGs, bem como um maior número de genes com valores de LogFC mais altos.

Em trabalho utilizando genótipos de arroz contrastantes para salinidade, Kawasaki et al. [45] observaram que para o genótipo tolerante houve um aumento no número de genes expressos até 1h de estresse, porém a partir das 3h ocorre uma diminuição que se torna menos pronunciada ao longo do tempo (7 dias). Entretanto, para o genótipo sensível essa resposta é retardada, levando a um grande número de genes *down-regulated* e posterior morte. A cultivar de arroz BRS Querência de acordo com a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) é considerada como tolerante ao estresse por sal, tolerante ao frio apenas nos estágios iniciais de desenvolvimento e também como moderadamente tolerante ao sal [26]. Assim, parte dos resultados aqui apresentados podem estar associados a esta tolerância.

Sob estresse por frio, foram encontrados muitos genes regulados negativamente para reações luminosas, principalmente relacionados ao fotossistema II e fotorrespiração. Em baixas temperaturas, todas as reações metabólicas são diminuídas, ocasionando um

acúmulo de intermediários fosforilados e a não liberação de Pi, limitando a regeneração da Ribulose Bisfosfato (RuBP) e a fotossíntese [46]. Além disso, ocorre um desequilíbrio do estado fotossintético aumentando a pressão de excitação no fotossistema II (FSII), ocasionando danos nesse fotossistema [47]. O aumento da atividade e abundância de diversas enzimas envolvidas na respiração, pode estar relacionado à manutenção da atividade fotossintética [48], podendo ser observado pelos diversos genes regulados positivamente no TCA e no transporte de elétrons na mitocôndria. Segundo Hannah et al. [49], a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e metabolismo secundário está correlacionada positivamente com a tolerância à baixa temperatura, entretanto, no presente estudo diversos genes referentes a esses dois metabolismos foram regulados negativamente, podendo ser um dos fatores de sensibilidade do arroz ao estresse por frio. O metabolismo de compostos nitrogenados também é afetado pela baixa temperatura [50], com genes de enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos sendo regulados positivamente, como é o caso do *Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase* (Os05g0455500), envolvido na biossíntese de prolina, conhecida por suas funções osmoprotetoras (Figura 4).

A toxidez por Fe causa alterações em diversos processos biológicos da planta, como na fotossíntese, respiração e assimilação de nitrogênio, além de danos às estruturas celulares [7,51,52,53]. Na figura 5A foi possível observar que o estresse por ferro durante 24h não ocasionou alterações severas no metabolismo da planta, ocorrendo basicamente a expressão de alguns genes referentes a reações luminosas e fotorrespiração. Um estudo com cultivares contrastantes à concentração elevada de ferro, demonstraram que a cultivar de arroz sensível apresentou efeitos fotooxidativos drásticos, enquanto o mesmo não foi observado em uma cultivar tolerante [7], corroborando os resultados encontrados neste estudo utilizando uma cultivar moderadamente-tolerante a esse estresse (BRS Querência).

Assim como nos outros dois estresses, altas concentrações de NaCl também causaram alterações nas reações luminosas, além de metabolismo de moléculas tetrapirrólicas, aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos. Plantas submetidas ao estresse salino reduzem suas taxas fotossintéticas principalmente pela diminuição dos níveis de pigmentos fotossintetizantes [54,55], entretanto, no presente estudo, diversos genes

relacionados à síntese de moléculas tetrapirrólicas (clorofila) foram regulados positivamente. A concentração de proteínas também pode ser afetada negativamente ou positivamente pelo estresse por NaCl [56,57], o que pode ser observado pelos diversos genes regulados positivamente no metabolismo de aminoácidos (Figura 5B).

Conclusão

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o estresse por baixa temperatura apresenta um número de genes diferencialmente expressos superior quando comparado com o estresse salino e por toxidez de ferro, em um período de 24 horas de estresse. Apesar de existir um maior número de DEGs em comum entre o estresse salino e por frio, a análise entre os genes compartilhados demonstra que o estresse por Fe e sal apresentam uma maior relação, devido ao baixo número de DEGs apresentado pelo estresse por ferro. O estresse por baixa temperatura também é o que apresenta maiores alterações e maior número de termos de GOs sobre-representados, entretanto, o principal processo fisiológico afetado em nível molecular, para os três estresses é a fotossíntese. Apesar da baixa temperatura apresentar maior número de DEGs, o estresse salino apresenta uma rede de interação de GOs para processos biológicos *up-regulated* mais complexa.

Referências bibliográficas

1. Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O. Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. Proteomics. 2013;13: 1801-15.

2. Cramer GR, Urano K, Delrot, S, Pezzoti M, Shinozaki K. Effect of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. BMC Plant Biol. 2011;11:163.

3. Rengasamy P. World salinization with emphasis on Australia. J Exp Bot. 2006;57:1017-23.

4. Munns R, Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance. Annu Rev Plant Biol. 2008;59:651-81.

5. Hussain K, Nisar MF, Majeed A, Nawaz K, Bhatti KH, Afghan S, Shahazad A, Zia-Ul-Hussnian S. What molecular mechanism is adapted by plants during salt stress tolerance? Afr J Biotechnol. 2010;9:416-22.

6. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.

http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush (2008). Acessado 15 jan 2015.

7. Stein RJ, Duarte GL, Spohr MG, Lopes SIG, Fett JP. Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. Ann Appl Biol. 2009;154:269-77.

8. Kirk, GJD. The biogeochemistry of submerged soils. 1st ed. Chichester UK:John Wiley & Sons; 2004.

9. Becker M, Asch F. Iron toxicity in rice – conditions and management concepts. J. Plant Nutr Soil Sci. 2005;168:558-73.

10. Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN. Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Chilling Stress Responses in Rice. Mol Cell Proteomics. 2006;5:484-96.

11. Lou Q, Chen L, Sun Z, Xing Y, Li J, Xu X, Mei H, Luo L. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica. 2007;158:87-94.

12. Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends Plant Sci. 2007;12:444-51.

13. Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. Plant Physiol. 2009;149:88-95.

14. Zhu JK. Regulation of ion homeostasis under salt stress. Curr Opin Plant Biol. 2003;6:441–45.

15. Shabala S, Cuin TA. Potassium transport and plant salt tolerance. Physiol Plant. 2008;133:651-69.

16. Sahrawat KL. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. J Plant Nutr. 2004;27:1471-504.

17. Majerus V, Bertin P, Lutts S. Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentrations in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). 2007; 173:96-105.

18. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu Rev Plant Biol. 2006;57:781-803.

19. Yadav SK. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. Agron Sustain Dev. 2010;30:515-27.

20. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. Exploring plant transcriptomes using ultra high-throughput sequencing. Brief Funct Genomics. 2010;9:118-28.

21. Mizuno H, Kawahara Y, Sakai H, Kanamori H, Wakimoto H, Yamagata H, Oono Y, Wu YJ, Ikawa H, Itoh Y, Matsumoto T. Massive parallel sequencing of mRNA in identification of unannotated salinity stress-inducible transcripts in rice (*Oryza sativa* L.). BMC Genomics 2010;11:683.

22. Oono Y, Kawahara Y, Kanamori H, Mizuno H, Yamagata H, Yamamoto M, Hosokawa S, Ikawa H, Akahane I, Zhu Z, Wu J, Itoh T, Matsumoto T. mRNA-Seq Reveals a Comprehensive Transcriptome Profile of Rice under Phosphate Stress. Rice. 2011;4:50-65.

23. Wakasa Y, Oono Y, Yazawa T, Hayashi S, Ozawa K, Handa H, Matsumoto T, Takaiwa F. RNA sequencing-mediated transcriptome analysis of rice plants in endoplasmic reticulum stress conditions. BMC Plant Biol. 2014;14:101.

24. Oono Y, Yazawa T, Kawahara Y, Kanamori H, Kobayashi F, Sasaki H, Mori S, Wu J, Handa H, Itoh T, Matsumoto T. Genome-wide transcriptome analysis reveals that cadmium stress signaling controls the expression of genes in drought stress signal pathways in rice. PLoS One. 2014;doi:10.1371/journal.pone.0096946.

25. Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. Laboratory manual for physiological studies of rice. 3rd ed. The Philippines: International Rice Research Institute (IRRI); 1976.

26. Benitez LC, Rodrigues ICS, Arge LWP, Ribeiro, MV, Braga EJB. Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa. Rev Ciênc Agron. 2011;42:409-16.

27. Singh RK, Redoña E, Refuerzo L. Varietal Improvement for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants: Special Reference to Salinity in Rice. In: Pareek A, Spory SK, Bohnert HJ, Govindjee, editors. Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomics Foundation. New York: Springer Science+Business Media LLC; 2010. p. 387-415.

28. Elec V, Quimio CA, Mendoza R, Sajise AGC, Beebout SEJ, Gregorio GB, Singh RK. Maintaining elevated Fe^{2+} concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil. 2013;372:253-64.

29. Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. Proteomics. 2005;5:3162-72.

30. FastQC. [http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/]

31. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30:2114-20.

32. Rice Annotation Project Database [http://rapdb.lab.nig.ac.jp/]

33. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics. 2009;25:1105-11.

34. Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 2012;9:357-59.

35. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics. 2015;31:166-9.

36. R Core Development Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna; 2014.

37. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 2008;26:139-40.

38. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol. 2004;5:R80.

39. Conesa A, Götz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics. 2005; 21:3674-76.

40. Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant J. 2004;37:914-39.

41. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. PLoS ONE. 2011;doi:10.1371/journal.pone.0021800.

42. Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. Plant Physiol. 2003;1331755-67.

43. Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF. Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. Plant Physiol. 2002; 130:2129-41.

44. Rensink W, Hart A, Liu J, Ouyang S, Zismann V, Buell CR. Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. Genome. 2005;48:598-605.

45. Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D,

Bohnert HJ. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell. 2001;13:889-905.

46. Sage RF, Kubien DS. The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. Plant Cell Environ. 2007;30:1086-1106.

47. Huner PA, Öquist G, Sarhan F. Energy balance and acclimation to light and cold. Trends Plant Sci. 1998;3:224-30.

48. Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, Kleczkowski LA, Gardeström P, Schröder W, Hurry V. The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. Plant J. 2006;47:720-34.

49. Hannah MA, Wiese D, Freund S, Fiehn O, Heyer AG, Hincha DK. Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 2006;142:98-112.

50. Usadel B, Blasing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Hoehne M, Gunther M, Stitt M. Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. Plant Cell Environ. 2008;31:518-47.

51. Suh HJ, Kim CS, Lee JY, Jung J. Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. Photochem Photobiol. 2002;75:513-8.

52. Asch F, Becker M, Kpongor DS. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. J Plant Nutr Soil Sci. 2005;168:764-773.

53. Briat JF, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. Ann Bot. 2010;105:811-22.

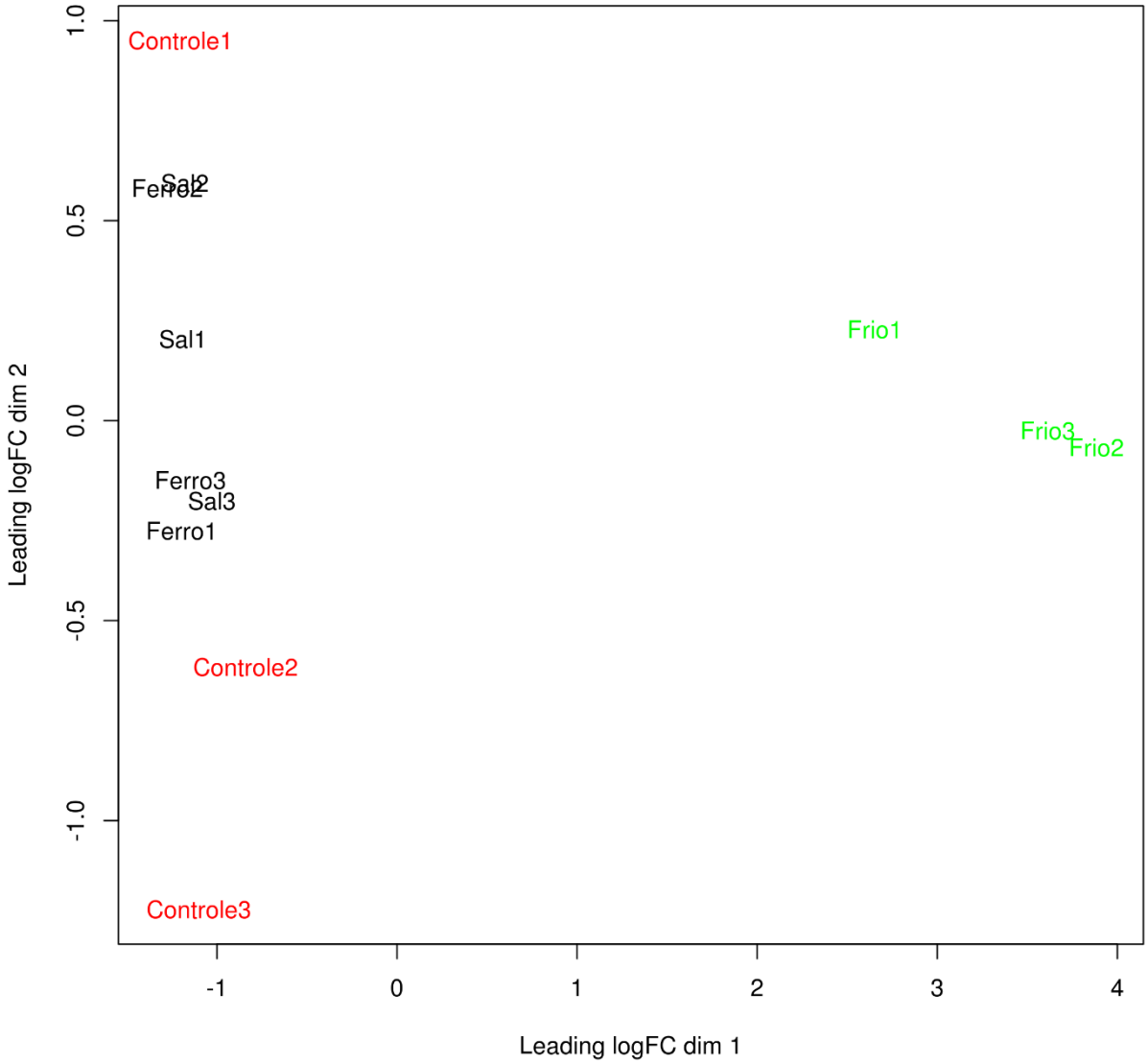
54. Sultana N, Ikeda T, Itoh R. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. Environ Exper Bot. 1999;42:211-220.

55. Misra AN, Latowski D, Strzalka K. The Xanthophyll Cycle Activity in Kidney Bean and Cabbage Leaves under Salinity Stress. Russ J Plant Physiol. 2006;53:102-109.

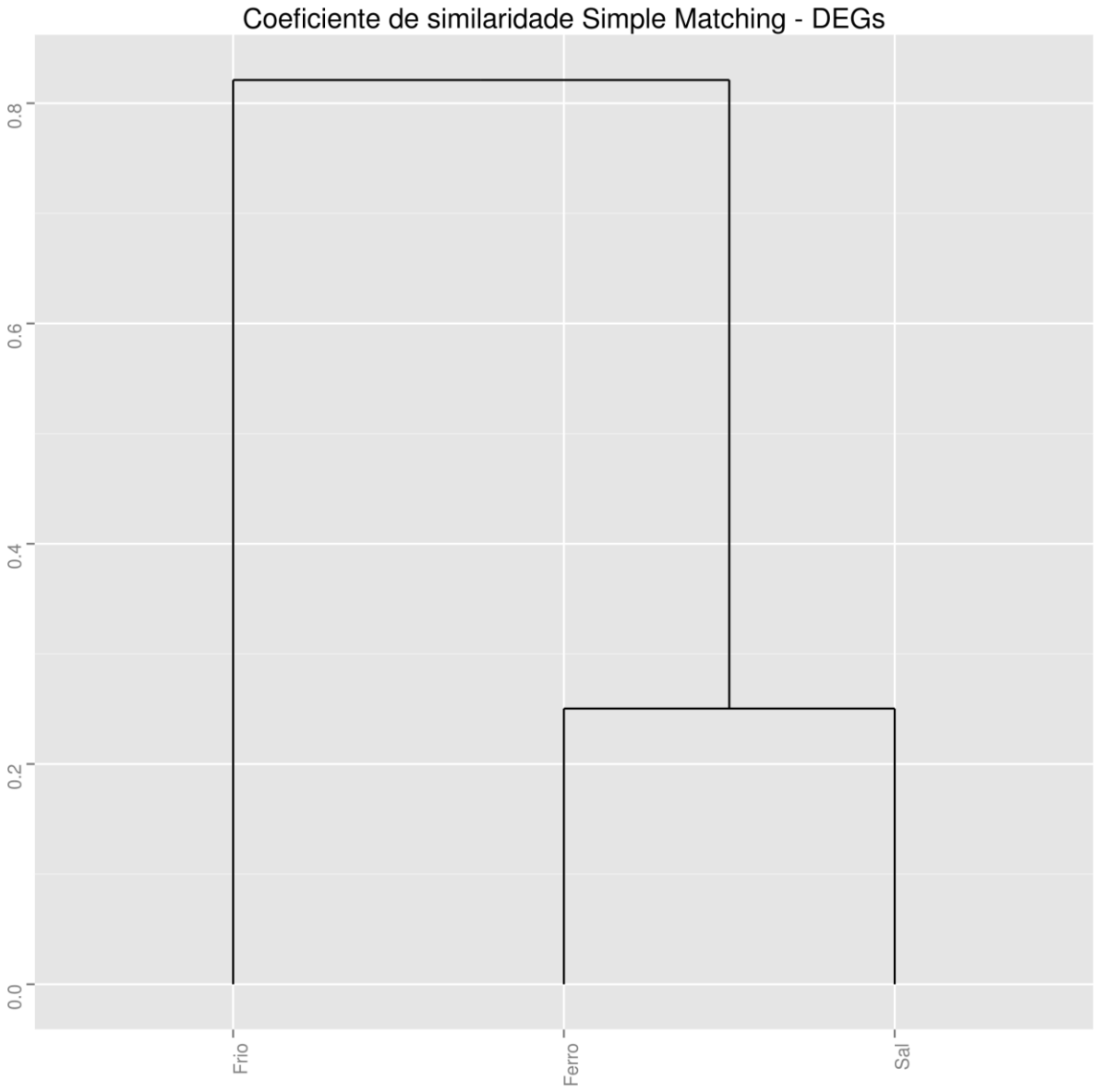
56. Chen C, Tao C, Peng H, Ding Y. Genetic analysis of salt stress responses in asparagus bean (*Vigna unguiculata* (L.) ssp. sesquipedalis Verdc.). J Hered. 2007;98:655-65.

57. Kapoor K, Srivastava A. Assessment of salinity tolerance of *Vinga mungo* var. Pu-19 using *ex vitro* and *in vitro* methods. Asian J Biotechnol. 2010;2: 73-85.

Material Suplementar



Material Suplementar 1 Resultado da análise de componentes principais do Log 2Fold Change (logFC) das bibliotecas de RNA-seq para ambos os estresses na cultivar de arroz BRS Querência.



Material Suplementar 2 Similaridade entre os diferentes estresses em plantas de arroz (cv. BRS Querência), com base no coeficiente de similaridade *Simple Matching* sobre os genes diferencialmente expressos.

Artigo 2 – Rice
(ISSN: 1939-8425)

Expressão diferencial de genes relacionados à fotossíntese e quantificação de trocas gasosas em plantas de arroz sob estresses abióticos

Resumo

Estresses abióticos causados por excesso de frio, ferro e sal, estão entre os principais fatores que limitam o crescimento e produtividade do arroz. Dentre os processos metabólicos, a fotossíntese destaca-se por estar intimamente relacionada com o rendimento das culturas, havendo um declínio na produtividade devido à redução da capacidade fotossintética em plantas sujeitas a estresses abióticos. Assim, este trabalho foi conduzido com o objetivo de elucidar a expressão diferencial de genes de cloroplasto e envolvidos com a fotossíntese através da metodologia de RNA-Seq e quantificar as trocas gasosas em folhas de arroz (cv. BRS Querência), no estádio V3, submetidas aos estresses por frio, excesso de ferro e sal em um período de 24 horas. Do total de genes expressos em cada estresse, o frio apresentou o maior número de genes diferencialmente expressos (DEGs) relacionados a reações luminosas e cloroplasto, com 307 genes, sendo a maioria *down-regulated*. O estresse salino e por ferro apresentaram 179 e 14 genes, respectivamente, envolvidos em reações luminosas e cloroplasto. Os estresses salino e por frio foram os únicos que apresentaram transcritos com Ontologia Gênica (GOs) relacionados a reações luminosas, ambos com cinco diferentes termos GOs. Com relação ao cloroplasto, o estresse por frio e salino apresentaram o maior número de termos GOs, ambos com seis termos, seguido pelo estresse por ferro com dois. Nos parâmetros de trocas gasosas, a taxa assimilatória liquida foi a única que apresentou diferença significativa entre os estresses, com o estresse por frio apresentando a menor média. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que o estresse por frio é o que afeta mais drasticamente a fotossíntese, tanto a nível molecular quanto fisiológico, e apesar de reduções na taxa assimilatória liquida, a cultivar BRS Querência demonstrou menores alterações nos estresses por ferro e sal, o que pode estar relacionado com a tolerância dessa cultivar.

Palavras-chave: estresse por frio; estresse por ferro; estresse salino; RNA-seq; *Oryza sativa* L.; FSII

Abstract

Abiotic stresses caused by excessive cold, iron and salt, are some of the main factors that limit rice growth and productivity. Among the metabolic processes, photosynthesis is notable for being closely related to the yield of crops, with a decline in productivity due to reduced photosynthetic capacity in plants subjected to abiotic stresses. Thus, this study has aimed to elucidate the differential expression of genes in chloroplast and also involved with photosynthesis through the methodology of RNA-Seq, as well as, quantifying gas exchanges in rice leaves (cv. BRS Querência) in V3 stage, under cold stress, iron and salt excess in a 24 hours period. From the total amount of genes expressed in each stress, cold presented the largest number of differentially expressed genes (DEGs) relating to bright reactions and chloroplast, with 307 genes, being most down-regulated. Saline and iron stress presented respectively 179 and 14 genes involved in light reactions and chloroplast. Saline and cold stresses were the only ones that have transcribed with Gene Ontology (GOs) relating to bright reactions, both with five different GOs terms. Considering the chloroplast, cold and saline stress have presented the largest number of GOs terms, both with six terms, followed by iron stress with two GOs terms. In gas exchange parameters, the net assimilation rate was the only one that has shown a significant difference between the stresses, with cold stress showing the smallest average. From the results obtained it was concluded that the cold stress is affecting more drastically photosynthesis, from molecular as physiological level, and despite reductions in net assimilation rate, BRS Querência showed minor changes in the stresses of iron and salt, which may be related to tolerance of this cultivar.

Keywords: cold stress; iron stress; saline stress; RNA-seq; *Oryza sativa* L.; PSII

Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.), segundo cereal mais cultivado e alimento básico para mais da metade da população mundial, é sensível a diversos fatores ambientais, tais como salinidade, baixas temperaturas e solos com excesso de ferro (Lafitte et al. 2004; FAO 2013). Neste contexto, estes três estresses abióticos estão entre os principais fatores que limitam o crescimento e produtividade da cultura.

As plantas por apresentarem hábito de crescimento séssil, ao longo do tempo, desenvolveram mecanismos em nível molecular, bioquímico e fisiológico, que lhes permitem sobreviver em situações adversas (Nakashima et al. 2012). Tais mecanismos são complexos e envolvem a expressão de diversos genes, bem como, severas alterações em processos metabólicos incluindo síntese de proteínas (Cramer et al. 2011), atividade de enzimas antioxidantes (Suzuki et al. 2012), fotossíntese (Parveen e Ashraf 2010; Adamski et al. 2011), respiração (Moud e Maghsoudi, 2008), metabolismo do nitrogênio e carboidratos (Chatterjee et al. 2006; Polesskaya et al. 2006), alterações nas membranas (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozak 2006), potencial osmótico (Munns e Tester 2008), e modificações no balanço de fitohormônios (Ashraf et al. 2010; Rahman 2013).

Dentre os processos metabólicos, a fotossíntese destaca-se por estar intimamente relacionada com o rendimento das culturas, havendo um declínio na produtividade devido à redução da capacidade fotossintética em plantas sujeitas a estresses abióticos (Saleem et al. 2011). Um efeito inicial do estresse salino sobre a fotossíntese está relacionado à diminuição da disponibilidade de CO_2 devido ao fechamento estomático que limita a difusão para o mesofilo, alteração da atividade e diminuição do conteúdo de enzimas como a ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase - RuBisCo, e alterações no Fotossistema II (PSII) (Netondo et al. 2004; Flexas et al. 2007; Yang et al. 2009).

Aproximadamente 80% do ferro nas plantas encontram-se em células fotossintetizantes, onde o excesso desse elemento acarreta na redução do conteúdo de clorofila, redução da assimilação de CO_2, desordem dos complexos fotossintéticos, aumento da resistência estomática e redução na taxa de transpiração (Sharma 2007; Timperio et al. 2007; Nenova 2009). Além disso, outro fator que reduz a taxa fotossintética em plantas é a baixa temperatura, a qual diminui a condutância estomática,

altera as membranas do tilacoide, reduz o conteúdo de clorofila e sua fluorescência, danifica os fotossistemas e interfere negativamente no desenvolvimento do cloroplasto (Farooq et al. 2009; Zhu et al. 2010).

Em nível molecular, as respostas das plantas aos estresses abióticos envolvem a modulação da expressão de diversos genes e *crosstalk* entre muitas vias moleculares (Takahashi et al. 2004). Diversos trabalhos utilizando a técnica de micrroarranjos relatam alterações na expressão de muitos genes relacionados com a fotossíntese em plantas submetidas a estresses abióticos, o que, neste sentido, demonstra ser um dos processos mais responsivos a fatores ambientais (Seki et al. 2002a, b; Rabbani et al. 2003; Matsui et al. 2008). Com o avanço dos sequenciadores de última geração, a técnica de RNA-seq tem possibilitado, com maior acurácia que a técnica de microarranjos, a elucidação de perfis transcricionais (Wang et al. 2010). Assim, o emprego dessas metodologias juntamente com parâmetros fisiológicos, possibilitam uma melhor compreensão dos diferentes processos biológicos alterados e com isto auxiliar no desenvolvimento de estratégias para produção de plantas tolerantes.

Frente ao exposto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de elucidar a expressão diferencial de genes de cloroplasto e envolvidos com a fotossíntese através da metodologia de RNA-Seq e quantificação de trocas gasosas em folhas de arroz (cv. BRS Querência), no estádio V3, submetida aos estresses por frio, excesso de ferro e sal, durante um período de 24 horas.

Material e Métodos

Material Vegetal

Sementes de arroz (cv. BRS Querência) foram germinadas em câmara de crescimento do tipo BOD, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C, e mantidas por um período de sete dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para bandejas plásticas (3L) contendo areia previamente lavada com água destilada e mantidas em casa de vegetação com temperatura de 26±2°C, umidade relativa do ar de aproximadamente 60%, e irrigação manual e alternada (intervalos de dois dias) com solução nutritiva de Yoshida padrão (Yoshida et al. 1976) e água. A escolha da cv. BRS Querência se deve ao fato dela ser caracterizada pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de

Pesquisa Agropecuária) como uma cultivar altamente produtiva e tolerante ao estresse por ferro, além de ser caracterizada por Benitez et al. (2011) como moderadamente tolerante ao estresse salino.

Ao atingirem o estádio V3 as plantas foram submetidas a três diferentes estresses, separadamente, durante 24 horas. Para o estresse salino e estresse por toxidez de Fe^{+2}, as plantas foram irrigadas com solução de Yoshida adicionada de 150 mM de NaCl, conforme Singh et al. (2010), e 300 mg L^{-1} Fe^{+2} conforme Elec et al. (2013), respectivamente e mantidas em casa de vegetação. Para o estresse por baixa temperatura, as plantas foram irrigadas com solução de Yoshida padrão e mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD com temperatura de 13°C e fotoperíodo de 16 horas, conforme Cui et al. (2005). O tratamento controle foi mantido em casa de vegetação e irrigado com solução de Yoshida padrão.

Tecidos foliares de um bulk de 50 plantas foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer à -80°C para posterior extração de RNA e análises. As plantas controle foram coletadas ao mesmo tempo que as plantas estressadas.

Preparo do cDNA e sequenciamento

O RNA total foi extraído, a partir de 100 mg de folhas (bulk de 50 plantas), utilizando Plant RNA Reagent Purelink® (Invitrogen*TM*). Sua integridade e qualidade foi verificada por espectrofotômetro NanoDrop ND-1000® (GE Healthcare*TM*) e a eletroforese realizada em gel de agarose 1%. As bibliotecas foram preparadas por meio do kit TruSeq RNA Sample Preparation® V 2 (Illumina*TM*), segundo recomendações do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi avaliada com o equipamento Agilent 2100 BioAnalyzer® (Agilent Technologies*TM*) utilizando o kit Agilent DNA 1000® (Agilent*TM*). O sequenciamento das bibliotecas foi do tipo *paired-end* 2x100pb realizado na plataforma HiSeq 2500® (Illumina*TM*).

Análise da qualidade e limpeza dos *reads*

Para a análise e visualização da qualidade das *reads*, foi utilizado o programa FastQC Ver. 0.1.1.2 (Andrews 2010). Após, o programa Trimmomatic Ver. 0.32 (Bolger

et al. 2014) foi utilizado para a remoção das bases com baixa qualidade e dos adaptadores de cada biblioteca. Os parâmetros para essa etapa foram: PE, indicando que as sequências estão no formato *paired-end*; *ILLUMINACLIP* para retirar as possíveis sequências de adaptadores; SLIDINGWINDOW:4:25, para retirar as bases de qualidade inferior a 25 dentro de uma janela de 4 bases; *LEADING*:10 e *TRAILING*:10, para retirar bases com qualidade inferior a 10, de ambos os lados dos *reads*; e MINLEN:90, para manter as *reads* com o mínimo de 90 bases, descartando os que apresentaram tamanho inferior a isto após a limpeza.

Identificação de genes diferencialmente expressos e anotaçao funcional

As *reads* foram mapeadas contra o genoma de referência de *Oryza sativa* cv. Nipponbare (IRGSP build 1.0) obtido a partir do The Rice Annotation Project Database [RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html)], através do software TopHat Ver. 2.0.11 (Trapnell et al. 2009), que utiliza o software Bowtie Ver. 0.12.7 (Langmead et al. 2012) para o mapeamento das *reads*, acrescentado de um algoritmo para detecção de *splicing alternativo*. O software HTseq Ver. 0.5.3 (Anders et al. 2014) foi utilizado para contagem das *reads*.

A identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada utilizando o programa R v3.1.0 (Core Team, 2014) com o pacote edgeR Ver. 3.8.5 (Robinson et al. 2010) obtido do repositório Bioconductor (Gentleman et al. 2004). Os níveis de expressão foram normalizados pelo método RPKM (*Reads per kilobase of transcript per million reads mapped*), sendo considerados diferencialmente expressos os genes com valores de $p < 0,01$ pelo teste exato de Fisher.

Os genes diferencialmente expressos foram submetidos a análise de enriquecimento utilizando o programa BLAST2GO Ver. 2.7.2, onde após a anotação e ontologia genica, os termos de GOs sobre-representados foram identificados utilizando o teste exato de Fisher ($p < 0,01$) corrigido pelo método de FDR (*false discovery rate*) com $p < 0,05$ (Conesa et al. 2005). Após realizada a anotação funcional dos DEGs realizou-se a identificação de genes relacionados a cloroplasto e fotossíntese pela detecção de termos GOs relacionados a tais ontologias.

Trocas gasosas

As trocas gasosas foram mensuradas em folhas completamente expandidas, através de um analisador portátil a infravermelho de CO2 (modeloLI-6400XT Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA), com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 1500 µmol m^{-2} s^{-1}, concentração de CO_2 no interior da câmara de 400 µmol mol^{-1} controlado pelo sistema de injeção de CO_2, e com umidade relativa entre 20 e 58%. A temperatura da folha foi de 27±2°C para os estresses salino e por ferro, e 14±2°C para o estresse por frio e o déficit de pressão de vapor do ar-folha entre 1 e 2 kPa. Todas as medições foram realizadas e armazenadas depois de atingir o estado de equilíbrio (coeficiente de variação <2%), sendo realizadas seis leituras por tratamento. Foram analisadas as seguintes variáveis: taxa de assimilação líquida de CO_2 [*A* (mol CO_2 m^{-2} área foliar s^{-1})], condutância estomática [*gS* (H_2O mol m^{-2} área foliar s^{-1})], concentração intercelular de CO_2 [*Ci* (µmol CO_2 mol^{-1})], taxa de transpiração [*Tr* (mmol H_2O m^{-2} área foliar s^{-1})] e ainda, calculado o uso eficiente da água [UEA, (mmol H_2O m^{-2} $s^{-1})^{-1}$] utilizando a seguinte fórmula: fotossíntese/transpiração.

Análise Estatística

Para os três estresses, o delineamento experimental foi completamente ao acaso, com três repetições por tratamento, onde cada repetição foi constituída de duas bandejas com 50 plantas em cada, totalizando 100 plantas por repetição. Os dados foram analisados através de uma análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o programa estatístico SAS 9.3 (SAS Institute, Cary NC).

Resultados

Genes diferencialmente expressos relacionados à fotossíntese

Um total de 41M - 51M *reads* foram submetidas ao alinhamento, sendo que deste total um intervalo entre 88,47 - 89,21% foram mapeados contra o genoma de referência cv. Nipponbare (IRGSP build 1.0), e de 6,60 - 25,27% do total de *reads* apresentaram múltiplos alinhamentos, as quais foram excluídas das análises posteriores para reduzir

prováveis erros.

Do total de genes expressos em cada estresse, o frio foi o que apresentou o maior número de DEGs com 5.506, onde 307 genes estão relacionados a reações luminosas e cloroplasto. O estresse salino apresentou 1808 DEGs, com 179 genes envolvidos em reações luminosas e cloroplasto. O estresse por ferro foi o que apresentou menor número de DEGs, apenas 630, sendo 14 relacionados a reações luminosas e cloroplasto (Figura 1).

Figura 1. Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos relacionados a fotossíntese e cloroplasto em plantas de arroz (cv. BRS Querência) submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas.

O maior número de DEGs relacionados à fotossíntese em comum a dois estresses ocorreu entre o estresse por baixa temperatura e o estresse salino, com 99 genes, entretanto apresentaram um padrão de expressão bem distinto, com o frio apresentado um maior número de genes *down-regulated*. Os estresses por frio e ferro, apresentaram três genes em comum (Os07g0160400 – proteína hipotética; Os02g0437200 - *Similar to SNAP-34*; Os01g0138900 - *Mandelate racemase/muconate lactonizing enzyme family protein*), sendo que todos foram *up-regulated* para a baixa temperatura e todos *down-regulated* para o estresse por Fe. O menor número de DEGs em comum foi entre o

estresse salino e por Fe, com dois genes (Os05g0589200 - *RNA polymerase sigma fator*; Os01g0711400 - *Similar to Victorin binding protein*), ambos *down-regulated* para os dois estresses.

O estresse por frio apresentou maior número de DEGs exclusivos, com 199 genes, sendo a maioria *down-regulated*. De modo oposto, o estresse salino apresentou 72 DEGs exclusivos, sendo a maioria *up-regulated* e três genes exclusivamente para o estresse por toxidez de ferro (Os01g0558850 - *Similar to peptidase M16 family protein*; Os02g0712000 - *Peptidase, trypsin-like serine and cysteine domain containing protein*; Os05g0539900 - *Protein of unknown function DUF1230 family protein*), todos *down-regulated*. Apenas seis DEGs foram comuns aos três estresses: Os02g0506600; Os04g0487200; Os06g0603000; Os07g0476900; Os07g0558300; Os10g0501500 (Figura 2).

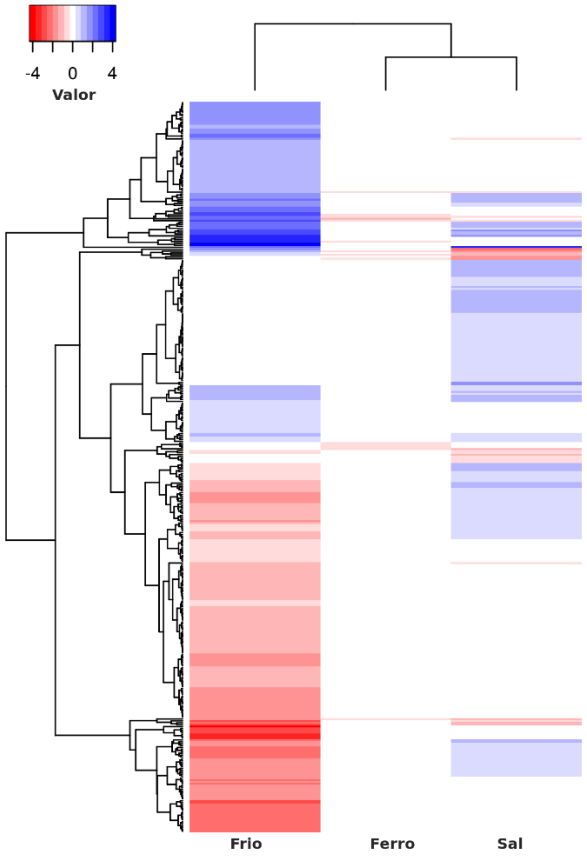


Figura 2. *Heatmap* dos genes diferencialmente expressos relacionados a fotossíntese e cloroplasto em plantas de arroz (cv. BRS Querência) submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas.

Caracterização dos termos GOs envolvidos com cloroplasto e fotossíntese

Sob os diferentes conjuntos de DEGs, os estresses salino e por frio foram os únicos que apresentaram transcritos com GOs relacionados a reações luminosas (RL), ambos com cinco diferentes termos GOs. Contexto similar ocorreu para GOs relacionados ao cloroplasto, onde o estresse por frio e salino apresentaram o maior número de termos GOs, ambos com seis termos, seguido pelo estresse por Fe com dois. Quanto a genes com GOs relacionados à reações luminosas, o estresse salino apresentou 162 DEGs, e o estresse por frio apresentou 41 DEGs. Para termos GOs relacionados ao cloroplasto, o frio apresentou 283 DEGs, e o estresse salino e por toxidez de Fe apresentaram 31 e 14 DEGs, respectivamente (Figura 3).

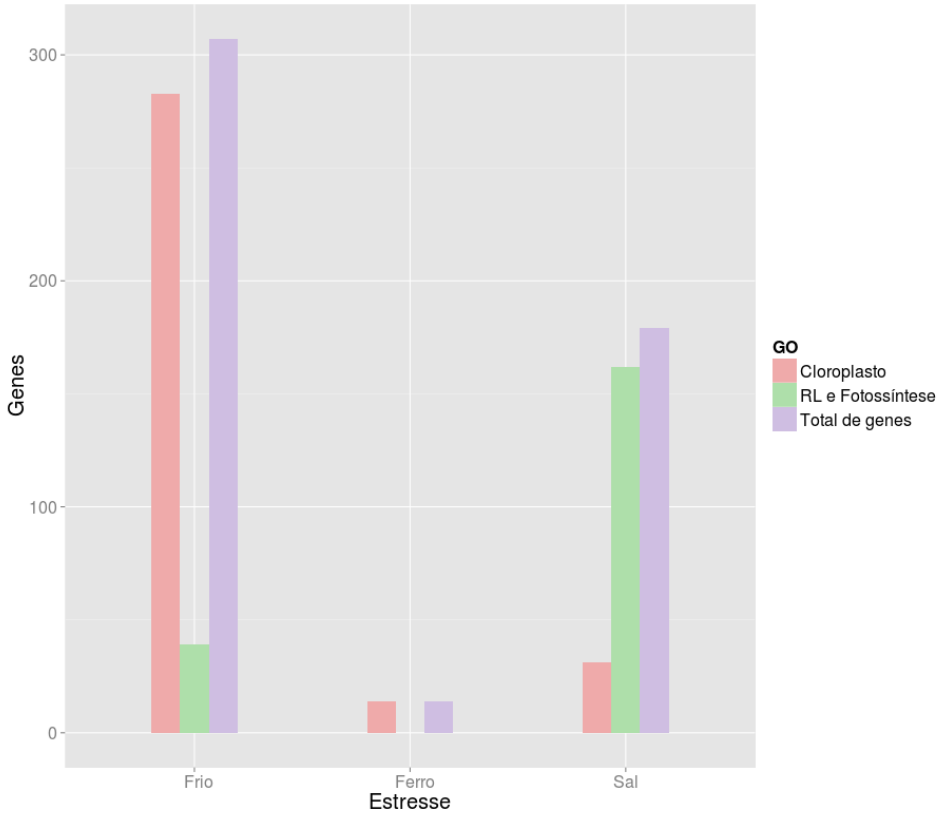


Figura 3. Número de DEGs totais detectados, e número de DEGs com GOs relacionados a cloroplasto e fotossíntese.

Os principais termos GOs relacionados à fotossíntese para o estresse por frio e salino são referentes a reações luminosas (*photosynthesis, light reaction* - GO:0019684), que apresentou oito e quatro DEGs respectivamente, e relacionados ao Fotossistema II (*photosystem II assembly* - GO:0010207), com 27 e 22 DEGs respectivamente. Os

termos GOs *photosynthesis, light harvesting* (GO:0009765), *photosynthetic electron transport chain* (GO:0009767), *photosystem I assembly* (GO:0048564) também apresentaram DEGs, porém em menor número (Tabela 1). Entre os principais termos GOs relacionados ao cloroplasto destacam-se *chloroplast* (GO:0009507) que apresentou 253 DEGs para o estresse por frio, 142 para o estresse salino e 12 para toxidez por ferro, e *chloroplast thylakoid* (GO:0009534) com 18 DEGs para o estresse por frio, 10 para o estresse por sal e dois para o por Fe. Os termos GOs *chloroplast nucleoid* (GO:0042644), *chloroplast part* (GO:0044434), *chloroplast photosystem II* (GO:0030095) e *chloroplast ribulose bisphosphate carboxylase complex* (GO:0009573) também apresentaram DEGs relacionados ao cloroplasto, porém somente para os estresses por baixa temperatura e salino.

Tabela 1. Sumário dos GOs relacionados com fotossíntese e cloroplasto detectados nos DEGs de plantas de arroz (cv. BRS Querência) submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas

	Acesso GO	Descrição do termo GO	Frio	Ferro	Sal
Fotossíntese	GO:0019684	photosynthesis, light reaction	8	0	4
	GO:0043155	negative regulation of photosynthesis, light reaction	0	0	0
	GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	1	0	1
	GO:0009767	photosynthetic electron transport chain	3	0	2
	GO:0009780	photosynthetic NADP+ reduction	0	0	0
	GO:0009777	photosynthetic phosphorylation	0	0	0
	GO:0048564	photosystem I assembly	2	0	4
	GO:0010207	photosystem II assembly	27	0	22
	GO:0009766	primary charge separation	0	0	0
	GO:0042548	regulation of photosynthesis, light reaction	0	0	0
Cloroplasto	GO:0009507	chloroplast	253	12	142
	GO:0030933	chloroplast ADPG pyrophosphorylase complex	0	0	0
	GO:0042648	chloroplast chromosome	0	0	0
	GO:0010368	chloroplast isoamylase complex	0	0	0
	GO:0042644	chloroplast nucleoid	3	0	3
	GO:0044434	chloroplast part	5	0	3
	GO:0030093	chloroplast photosystem I	0	0	0
	GO:0030095	chloroplast photosystem II	3	0	3
	GO:0045320	chloroplast proton-transporting ATP synthase complex	0	0	0
	GO:0043253	chloroplast ribosome	0	0	0
	GO:0009573	chloroplast ribulose bisphosphate carboxylase complex	1	0	1
	GO:0009569	chloroplast starch grain	0	0	0
	GO:0009534	chloroplast thylakoid	18	2	10

Trocas gasosas

Na Tabela 2, estão apresentados os resultados de taxa de assimilação líquida de CO_2 [*A* (mol CO_2 m^{-2} área foliar s^{-1})], condutância estomática [*gS* (H_2O mol m^{-2} área foliar s^{-1})], concentração intercelular de CO_2 [*Ci* (µmol CO_2 mol^{-1})], taxa de transpiração [*Tr* (mmol H_2O m^{-2} área foliar s^{-1})] e uso eficiente da água (EUA) para as plantas de arroz submetidas às condições controle, estresse por frio, ferro e sal.

Tabela 2. Taxa de assimilação líquida CO2 (*A*), condutância estomática (g*S*), concentração intercelular de CO2 (*Ci*), transpiração foliar (*Tr*) e eficiência do uso da água (UEA) em plantas de arroz (cv. BRS Querência), submetidas aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas

Estresse	*A*	*gS*	C_i	*Tr*	EUA
Controle	34,68 A*	$0,5885^{ns}$	$270,25^{ns}$	$10,29^{ns}$	$3,46^{ns}$
Frio	24,20 C	0,4226	219,50	9,31	2,84
Ferro	29,85 B	0,6514	293,00	11,14	2,77
Sal	32,33 AB	0,4848	260,50	9,09	3,57
CV (%)	7,37	30,14	14,09	12,08	14,39

*Valores seguidos por letras distintas, na coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); ns, não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Para o parâmetro de taxa assimilatória liquida de CO_2 (*A*) o tratamento controle apresentou o maior valor, com média de 34,68 mol CO_2 m^{-2} área foliar s^{-1}, diferindo significativamente dos estresses por ferro e frio, entretanto não diferiu significativamente do estresse salino. Seguido do controle, o estresse por sal apresentou um valor médio de A de 32,33, porém não diferiu significativamente do estresse por toxidez de Fe, que apresentou média de 29,85. O maior decréscimo na taxa assimilatória liquida foi no estresse por frio, que diferiu significativamente de todos os outros tratamentos, apresentando uma média de 24,20 mol CO_2 m^{-2} área foliar s^{-1}.

A variação em *A*, não foi acompanhada pelos parâmetros de condutância estomática, concentração intercelular de CO_2, taxa de transpiração e uso eficiente da água, os quais não apresentaram diferença estatística significante ao valor de p de 0,05 entre os tratamentos.

Discussão

Neste estudo, foi utilizado o sequenciamento de RNA (RNA-seq) e o mensuramento de trocas gasosas em folhas de arroz da cultivar BRS Querência submetida aos estresses por frio, ferro e sal durante 24 horas, para analisar as principais alterações relacionadas à fotossíntese, tanto em nível molecular quanto fisiológico.

Normalmente, o número de DEGs está associado á tolerância ou sensibilidade de um genótipo a um determinado estresse. Cultivares que apresentam maior tolerância possuem um menor número de DEGs, enquanto cultivares mais sensíveis apresentam maior número, principalmente de genes *down-regulated* (Walia et al. 2005; Maron et al. 2008; Degenkolbe et al. 2009). Neste trabalho, o estresse por frio apresentou um maior número de DEGs, sendo a maioria *down-regulated*, o que pode estar relacionado a uma maior tolerância da cultivar BRS Querência ao estresse por ferro e sal. Além disso, as análises de *heatmap* dos DEGs comuns a dois ou três estresses demonstram um padrão de expressão mais similar entre os estresses salino e por ferro, possivelmente pela natureza iônica comum a ambos.

Entre os genes comuns ao estresse salino e por frio, alguns responsivos a estresses abióticos foram regulados negativamente, como Os01g0205200 (*Protein prenyltransferase*), Os02g0735200 (*Glutamine synthetase*), Os01g0835900 (*Histone H4 family protein*) (Sahi et al. 2003; Cai et al. 2009; Nawaz et al. 2014). Entretanto, um grande número de genes apresentou uma regulação negativa para o estresse por frio e positiva para o estresse salino, como o caso do fator de transcrição WRKY 11 (Os03g0758900). Esse fator de transcrição participa de diversos processos fisiológicos da planta, como senescência, morfogênese, sinalização de ABA e Giberelina, e é induzido por vários estresses abióticos e bióticos (Seki et al. 2002a; Rizhsky et al. 2002; Zhang et al. 2004; Lee et al. 2005).

O gene *RNA polymerase sigma fator* (SIG - Os05g0589200), que expressa uma subunidade da RNA Polimerase presente no cloroplasto, comum ao estresse salino e por ferro, apresentou regulação negativa para ambos. O SIG está envolvido na transcrição de diversos genes de tRNAs nos cloroplastos, possibilitando a tradução de proteínas, bem como a síntese de pigmentos em cloroplastos (Kanamaru e Tanaka 2004). A

regulação negativa desse gene pode ser um dos prováveis motivos da redução na taxa assimilatória liquida nesses dois estresses.

Diversos estudos têm descrito o PSII, o complexo fotossintético localizado na membrana do tilacoide e responsável pela evolução fotossintética do oxigênio, como um alvo de muitas condições de estresse abióticos, como metais pesados, fotoinibição, seca e temperaturas baixas (Allen e Ort 2001; Pérez-Bueno et al. 2004; Singh-Tomar et al. 2012). Em trabalho com genótipos de tomate contrastante ao estresse por baixa temperatura, Liu et al. (2012) através da análise do transcriptoma relataram maior inibição do PSII no genótipo sensível. Neste estudo, alguns dos genes exclusivos *down-regulated* nas plantas submetidas ao estresse por frio foram referentes ás subunidades do PSII (Os03g0279950, Os03g0747700, Os07g0105600). Além de reduzir a expressão de genes relacionados ao PSII, baixas temperaturas diminuem a fluidez da membrana fazendo com que haja uma diminuição na taxa de renovação de proteínas D1 e D2, devido a um retardo na difusão de proteínas danificadas para degradação (Allen e Ort 2001). Um gene que codifica a subunidade menor da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase (Os12g0291400) e um que expressa uma subunidade do fotossistema I (Os07g0435300), também foram regulados negativamente.

Entretanto, as plantas desenvolveram mecanismos para proteger seu aparato fotossintético, sendo os carotenoides um dos mais importantes. O gene *Lycopene B-cyclase* (Os02g0190600), que expressa uma enzima localizada nos cloroplastos e responsável pela síntese de carotenoides, foi regulado negativamente pelo estresse por baixa temperatura. A inibição da enzima *Lycopene B-cyclase* reduz drasticamente a síntese de carotenoides, levando a uma menor proteção, além de danos na membrana do cloroplasto (La Rocca et al. 2007).

Além disso, existem relatos que o estresse por frio induz apoptose em células vegetais devido à perda da função das membranas, desintegração do cloroplasto, inativação de enzimas e fragmentação da cromatina (Koukalova et al. 1997; Wang et al. 2001). A melatonina, além de possuir diversas funções no crescimento e desenvolvimento das plantas, desempenha um papel na inibição da apoptose induzida por estresses ambientais, como o frio (Lei et al. 2004). A família de proteínas *GCN5-related N-acetyltransferase* (GNAT) é responsável por catalisar a transferência do grupo

acetil a partir da acetil-coenzima A para uma série de moléculas e faz parte da rota de biossíntese da melatonina. Recentemente, diversos genes que codificam a enzima N-acetiltransferase, penúltima enzima na rota de síntese da melatonina em plantas, foram caracterizados em arroz (Kang et al. 2013). Neste trabalho, dois genes (Os04g0465500 e Os08g0102000) responsáveis pela síntese dessa enzima tiveram uma menor expressão em relação ao controle. Isso demonstra que para a cultivar BRS Querência, o estresse por baixa temperatura inibiu a expressão de genes relacionados com a síntese de moléculas protetoras do aparelho fotossintético e de membranas.

A fotossíntese em plantas de origem de clima tropical é substancialmente afetada pelo frio, em um processo chamado fotoinibição por baixa temperatura (Allen e Ort 2001). Neste estudo, o estresse por frio foi o que apresentou maior redução na taxa assimilatória liquida, confirmando esse fenômeno. Entretanto, essa redução não foi devido à queda na concentração interna de CO_2, pois geralmente há uma relação entre baixa condutância estomática e *Ci* com uma baixa taxa assimilatória liquida, porém neste estudo, esses dois fatores não diferiram estatisticamente do controle em nenhum estresse, corroborando o encontrado por Savvides et al. (2012). Assim, estes resultados sugerem que *gS* e *Ci* não são fatores limitante para *A* em um período de 24h de estresse. Em estudo semelhante, Yan et al. (2006) também relataram uma diminuição na taxa assimilatória liquida de CO_2 em plantas de arroz sem haver alterações nos parâmetros de *gS* e *Ci* quando submetidas a 24h de estresse por baixa temperatura. Esse decréscimo em *A* provavelmente é resultante de outros fatores, como atividade da Rubisco e disponibilidade de ATP, ambos afetados drasticamente por baixas temperaturas (Sage 2002; Sage e Kubien 2007).

O fato de genes responsáveis pela síntese de moléculas protetoras do aparelho fotossintetizante e membranas, como carotenoides e melatonina, respectivamente, apresentarem uma expressão diminuída no estresse por frio demonstra a vulnerabilidade dos fotossistemas quando submetidos a este estresse. Aliado a isso, uma regulação negativa de genes responsáveis por subunidades do fotossistema II, demonstram que o reparo deste fotossistema é insuficiente para manter a taxa assimilatória liquida em baixas temperaturas.

No estresse salino, apenas seis genes exclusivos foram *down*-regulated. Entre eles está o gene que expressa a enzima *Carotenoid cleavage dioxygenase*, responsável

pela síntese de carotenoides e derivados (Schwartz et al. 2001), como o Ácido abscísico (ABA), o que demonstra que um tempo de 24 horas pode não ter sido tão estressante para uma cultivar moderadamente tolerante. Outro gene *down-regulated* exclusivo para o sal foi *Chlorophyll A-B binding protein Family* (Os09g0296800), que são apoproteínas do complexo antena do PSII e que são necessárias para respostas estomáticas ao ABA, corroborando a hipótese anterior (Jansson 1994; Park et al. 2012; Xu et al. 2012). Porém, a maioria dos DEGs exclusivos para o estresse salino foram regulados positivamente, sendo o gene responsável por uma *Abc transporter atpase* (Os03t0332700), um dos mais expressivos. As proteínas transportadoras do tipo *abc atpase* participam em diversos processos fisiológicos em plantas, biossíntese de clorofila, movimento de estômato e, principalmente, na homeostase de íons (Martinoia et al. 2012). Outros genes como *Photosystem II stability assembly factor hcf136* (Os06g0729650), *Photosystem II 11 kd protein* (Os03g0333400) e *Nucleobase:cation symporter- ncs1 family* (Os08t0560600) também foram *up-regulated*.

Os efeitos da salinidade na fotossíntese normalmente são atribuídos ao fechamento estomático que limita a difusão de gases, e assim alterando o seu metabolismo (Chaves et al. 2009). Além disso, altas concentrações de NaCl causam degradações nos pigmentos fotossintéticos e redução na atividade do PSII (Boriboonkaset et al. 2013). Neste estudo, apesar de haver um pequeno decréscimo na média de *A*, não houve diferenças significativas entre o estresse salino e o controle para nenhum dos parâmetros analisados. No entanto, Kawasaki et al. (2001) observaram uma queda significativa na taxa assimilatória liquida em plantas de arroz submetidas a estresse salino (150mM) em minutos, diferente dos resultados obtidos neste trabalho. O fato da cultivar BRS Querência apresentar um grande número de genes *up-regulated*, sendo alguns responsáveis pela homeostase de íons e fotossistema II, e pequenas alterações no metabolismo fotossintético após 24 horas, podem estar associados a tolerância dessa cultivar ao estresse salino.

A toxidez por ferro não promoveu grandes alterações em nível molecular, sendo este estresse o que apresentou o menor número de DEGs, todos relacionados ao cloroplasto. Entretanto houve uma redução na taxa assimilatória liquida que diferiu significativamente do tratamento controle. Estudos com toxidez por Fe demonstram que

em concentrações moderadas (4mM) uma redução na taxa assimilatória liquida é atribuída apenas a limitações estomáticas, enquanto em doses mais elevadas (9mM) tanto a limitação estomática quanto não-estomáticas são responsáveis por essa redução (Pereira et al. 2013). Entretanto, nossos resultados corroboram os de Quinet et al. (2012) que demonstraram um aumento na condutância estomática nos tempos iniciais de estresse por ferro, seguido por uma redução somente após 2 semanas, havendo danos ao PSII e redução na concentração de Clorofila *a* e *b*. Assim como para o estresse salino, uma alta concentração de Fe^{+2} por apenas 24 horas não pareceu ser suficiente para desencadear o fechamento estomático, onde a redução em *A* pode estar associada principalmente aos danos ao PSII.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o estresse por frio é o que apresenta maior número de DEGs *down-regulated* relacionados à fotossíntese e cloroplasto, e também maior redução na taxa assimilatória liquida. Isso demonstra que em 24 horas de estresse, baixas temperaturas afetam drasticamente a fotossíntese, tanto a nível molecular como fisiológico. Apesar de reduções na taxa assimilatória liquida, a cultivar BRS Querência demonstrou menores alterações nos estresses por ferro e sal, o que pode estar relacionado com a tolerância dessa cultivar. Para os três estresses, alterações na taxa assimilatória liquida estão relacionadas a processos não-estomáticos.

Referências bibliográficas

Adamski JM, Peters JA, Danieloski R, Bacarin MA (2011) Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. J Plant Physiol 168:2056-62

Allen DJ, Ort DR (2001) mpacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends Plant Sci 6(1):36-42

Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31(2):166-9

Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data, http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Ashraf MA, Ashraf M, Ali Q (2010) Response of two genetically diverse wheat cultivars to salt stress at different growth stages: leaf lipid peroxidation and phenolic contents. Pak J

Bot 42(1):559-565

Benitez LC, Rodrigues ICS, Arge LWP, Ribeiro, MV, Braga EJB (2011) Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa. Rev Ciênc Agron 42(2):409-16

Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114-20

Boriboonkaset T, Theerawitaya C, Yamada N, Pichakum A, Supaibulwatana K, Cha-Um S, Takabe T, Kirdmanee C (2013) Regulation of some carbohydrate metabolism-related genes, starch and soluble sugar contents, photosynthetic activities and yield attributes of two contrasting rice genotypes subjected to salt stress. Protoplasma 250(5):1157-67

Cai H, Zhou Y, Xiao J, Li X, Zhang Q, Lian X (2009) Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. Plant Cell Rep 28(3):527-37

Chatterjee C, Gopal R, Dube BK (2006) Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). Sci Hort 108(1):1-6

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Ann Bot 103(4):551-560

Conesa A, Götz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics 21(18):3674-76

Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. BMC Plant Biology. doi:10.1186/1471-2229-11-163

Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. Proteomics 5(12):3162-72

Degenkolbe T, Do PT, Zuther E, Repsilber D, Walther D, Hincha DK, Köhl KI (2009) Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. Plant Mol Biol 69(1-2):133-53

Elec V, Quimio CA, Mendoza R, Sajise AGC, Beebout SEJ, Gregorio GB, Singh RK (2013) Maintaining elevated Fe2+ concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil 372(1-2):253-64

Farooq M, Aziz T, Wahid A, Lee DJ, Siddique KHM (2009) Chilling tolerance in maize: agronomic and physiological approaches. Crop Pasture Sci 60(6):501-516

Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO2 concentration around leaves. Plant Cell Environ 30(10):1284-98

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH, Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol 5(10):R80

Jansson S (1994) The light-harvesting chlorophyll a/ b-binding proteins. Biochim Biophys Acta 1184(1):1-19

Kanamaru K, Tanaka K (2004) Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. Biosci Biotechnol Biochem 68(11):2215-23

Kang K, Lee K, Park S, Byeon Y, Back K (2013) Molecular cloning of rice serotonin N-acetyltransferase, the penultimate gene in plant melatonin biosynthesis. J Pineal Res 55(1):7-13

Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell 13(4):889-905

Koukalova B, Kovarik A, Fajkus J, Siroky J (1997) Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. FEBS Lett 414:289-292

La Rocca N, Rascio N, Oster U, Rüdiger W (2007) Inhibition of lycopene cyclase results in accumulation of chlorophyll precursors. Planta 225(4):1019-29

Lafitte HR, Ismail A, Bennett J (2004) Abiotic stress tolerance in rice for Asia: Progress and the future. In: Fischer T, Turner N, Angus J, McIntyre L, Robertson M, Borrell A, et al. (eds). New Directions for a Diverse Planet: Proceedings for the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, 2004

Langmead B, Salzberg S (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 9(4):357-59

Lee BH, Henderson DA, Zhu JK (2005) The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. Plant Cell 17(11):3155-75

Lei XY, Zhu RY, Zhang GY, Dai YR (2004) Attenuation of cold-induced apoptosis by exogenous melatonin in carrot suspension cells: the possible involvement of polyamines. J Pineal Res 36(2):126-31

Liu H, Ouyang B, Zhang J, Wang T, Li H, Zhang Y, Yu C, Ye Z (2012) Differential

modulation of photosynthesis, signaling, and transcriptional regulation between tolerant and sensitive tomato genotypes under cold stress. PLoS One 7(11):e50785

Maron LG, Kirst M, Mao C, Milner MJ, Menossi M, Kochian LV (2008) Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. New Phytol 179:116-128

Martinoia E, Meyer S, De Angeli A, Nagy R (2012) Vacuolar transporters in their physiological context. Annu Rev Plant Biol 63:183-213

Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M, Satou M, Kim JM, Kobayashi N, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M (2008) Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. Plant Cell Physiol 49(8):1135-49

Moud AM, Maghsoudi K (2008) Salt Stress Effects on Respiration and Growth of Germinated Seeds of Different Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. World J Agric Sci 4(3):351-358

Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu Rev Plant Biol 59:651-81

Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochim Biophys Acta 1819(2):97-103

Nawaz I, Iqbal M, Hakvoort HWJ, Bliek M, Boer B, Schat H (2014) Expression levels and promoter activities of candidate salt tolerance genes in halophytic and glycophytic Brassicaceae. Environ Exper Bot 99:59-66

Nenova VR (2009) Growth and photosynthesis of pea plants under different iron supply. Acta Physiol Plant 31(2):385-91

Netondo GW, Onyango JC, Beck E (2004) Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. Crop Sci 44(3):806-811

Quinet M, Vromman D, Clippe A, Bertin P, Lequeux H, Dufey I, Lutts S, Lefèvre I (2012) Combined transcriptomic and physiological approaches reveal strong differences between short- and long-term response of rice (*Oryza sativa*) to iron toxicity. Plant Cell Environ 35(10):1837-59

Park SH, Chung PJ, Juntawong P, Bailey-Serres J, Kim YS, Jung H, Bang SW, Kim YK, Choi YD, Kim JK (2012) Posttranscriptional Control of Photosynthetic mRNA Decay under Stress Conditions Requires 3′ and 5′ Untranslated Regions and Correlates with Differential Polysome Association in Rice. Plant Physiol 159(3):1111-1124

Parveen N, Ashraf M (2010) Role of silicon in mitigating the adverse effects of salt stress on growth and photosynthetic attributes of two maize (*Zea mays* L.) cultivars grown hydroponically. Pak J Bot 42(3):1675-1684

Pereira EG, Oliva MA, Rosado-Souza L, Mendes GC, Colares DS, Stopato CH, Almeida AM (2013) Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations. Plant Sci 201-202:81-92

Pérez-Bueno ML, Rahoutei J, Sajnani C, García-Luque I, Barón M (2004) Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotec stress: Studies on Nicotiana benthamiana infected with tobamoviruses. Proteomics 4(2):418-25

Polesskaya OG, Kashirina EI, Alekhina ND (2006) Effect of salt stress on antioxidant system of plants as related to nitrogen nutrition. Russ J Plant Physl 53(2):186-192

R CoreTeam (2014). R package, http://www.r-project.org/

Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. Plant Physiol 133(4):1755-67

Rahman A (2013) Auxin: a regulator of cold stress response. Physiol Plant 147(1):28-35

Rizhsky L, Liang HJ, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiol 130(3):1143-1151

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2008) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26(1):139-40

Sage RF (2002) Variation in the k(cat) of Rubisco in C(3) and C(4) plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. J Exp Bot 53(369):609-20

Sage RF, Kubien DS (2007) The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. Plant Cell Environ 30(9):1086-1106

Sahi C, Agarwal M, Reddy, MK, Sopory SK, Grover A (2003) Isolation and expression analysis of salt stress-associated ESTs from contrasting rice cultivars using a PCR-based subtraction method. Theor Appl Genet 106(4):620-628

Saleem A, Ashraf M, Akram NA (2011) Salt (NaCl)-Induced Modulation in some Key Physio-Biochemical Attributes in Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). J Agron Crop Sci 197(3):202-213

Savvides A, Fanourakis D, Van Ieperen W (2012) Co-ordination of hydraulic and

stomatal conductances across light qualities in cucumber leaves. J Exp Bot 63(3):1135-1143

Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. J Biol Chem 276(27):25208-11

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. Plant J 31(3):279-292

Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. Funct Integr Genomics 2(6):282-91

Sharma S (2007) Adaptation of photosynthesis under iron deficiency in maize. J Plant Physiol 164(10):1261-7

Singh RK, Redoña E, Refuerzo L (2010) Varietal Improvement for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants: Special Reference to Salinity in Rice. In: Pareek A, Spory SK, Bohnert HJ, Govindjee (ed) Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomics Foundation. Springer Science+Business Media LLC, New York

Singh-Tomar R, Mathur S, Allakhverdiev SI, Jajoo A (2012) Changes in PS II heterogeneity in response to osmotic and ionic stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). J Bioenerg Biomembr 44(4):411-9

Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. Plant Cell Environ 35(2):259-270

Takahashi S, Seki M, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Narusaka M, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray. Plant Mol Biol 56(1):29-55

Timperio AM, D'Amici GM, Barta C, Loreto F, Zolla L (2007) Proteomic, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. J Exp Bot 58(13):3695-710

Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics 25(9):1105-11

Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail AM, Zeng L, Wanamaker SI, Mandal J, Xu

J, Cui X, Close TJ (2005) Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. Plant Physiol 139(2):822-35

Wang CY, Bowen JH, Weir IE, Allan AC, Ferguson IB (2001) Heat-induced protection against death of suspension-cultured apple fruit cells exposed to low temperature. Plant Cell Environ 24(11): 1199-1207

Wang L, Li P, Brutnell TP (2010) Exploring plant transcriptomes using ultra high-throughput sequencing. Brief Funct Genomics 9(2):118-128

Xu YH, Liu R, Yan L, Liu ZQ, Jiang SC, Shen YY, Wang XF, Zhang DP (2012) Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in Arabidopsis. J Exp Bot 63(3):1095-106

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu Rev Plant Biol 57:781-803

Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN (2006) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. Mol Cell Proteomics 5(3):484-96

Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Sci 14(1):1-4

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute (IRRI), Philippines

Zhang ZL, Xie Z, Zou XL, Casaretto J, Ho THD, Shen QXJ (2004) A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. Plant Physiol 134(4):1500-1513

Zhu XC, Song FB, Xu HW (2010) Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. Plant Soil 331(1-2):129-137