

## Caracterização do Transcriptoma da Soja Frente à Inoculação de Nematóide Causador de Lesões Radiculares

**Valéria S Lopes-Caitar<sup>1</sup>, Luciano N Aoyagi<sup>2</sup>, Luana M Darben<sup>3</sup>, Adriana Polizel-Podanosqui<sup>5</sup>, Mayra C C G de Carvalho<sup>4</sup>, Marcia K Kuwahara<sup>5</sup>, Waldir P Dias<sup>5</sup>, Francismar C Marcelino-Guimarães<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Ciência da Computação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Cornélio Procópio-Paraná, CEP 86300-000– E-mail:valopes@cnpso.embrapa.br; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-Paraná; <sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Paraná; <sup>4</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes-Paraná; <sup>5</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Soja, Londrina-Paraná.

### RESUMO

*Os nematóides causadores de lesões radiculares (Pratylenchus sp.) representam um dano grave para a soja e outras culturas agrícolas, causando impactos econômicos globais. Para identificar genes diferencialmente expressos (GDE) na interação planta-nematóide, genótipos suscetível (TGM 115 RR) e resistente (BRSGO Chapadões) foram inoculados com o nematóide, Pratylenchus brachyurus, e bibliotecas de RNA-seq de raízes inoculadas em quatro diferentes tempos pós-inoculação foram construídas. Assim, no presente estudo, foi realizada a caracterização do transcriptoma de dois genótipos de soja durante a interação inicial com nematóide da lesão radicular. RNA foi extraído das raízes dos dois genótipos e sequenciado com a plataforma Genome Analyzer. Os reads single-end foram mapeados nos transcritos preditos de soja para a identificação dos genes expressos. Um total de 1.766 e 2.464 DGE foram identificados nos genótipos resistente e suscetível, respectivamente. Um número maior de GDE associados à resposta ao estresse (GO) foi identificado no genótipo resistente em relação ao suscetível, em todos os tratamentos.*

**Palavras-chave:** RNA-seq, interação soja - nematóide, mecanismos moleculares de resistência, *Pratylenchus brachyurus*.

### INTRODUÇÃO

Desde sua introdução, a cultura da soja no Brasil apresentou uma evolução significativa, e que tem sido cada vez mais intensificada pelas tecnologias geradas por Universidades e Institutos de pesquisas, com o desenvolvimento de cultivares superiores. Contudo, ainda são necessários esforços para sobrepujar as condições ambientais adversas, que causam estresses, e afetam de modo direto ou indireto, o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade da cultura. Dentre estas, as doenças provocadas por fitopatógenos (fungos, nematóides e vírus), têm provocado quedas frequentes na produtividade da soja<sup>1</sup>. Atualmente no Brasil, os nematóides de maior importância patológica são os formadores de galhas (*Meloidogyne spp*), o de cisto (*Heterodera glycines*), o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) e o *Pratylenchus*

*brachyurus*<sup>2</sup>. Esta última espécie é conhecida como "nematóide das lesões radiculares", e representa, atualmente, um problema para diversos sistemas de produção, causando impacto econômico mundial e nacional para várias culturas agrícolas<sup>3</sup>.

No estado do Mato Grosso, análises do solo frequentemente apontam populações de *P. brachyurus* extremamente elevadas, causando reduções de produtividade de até 30%<sup>4</sup>. Para superar os desafios e demandas nacionais da cultura da soja, são realizados diversos estudos, na busca por soluções para os problemas causados por esse fitonematóide. Alguns estudos têm como foco substâncias nematicidas. Contudo, esses produtos não têm se apresentado tão eficientes, além de serem nocivos ao meio ambiente e onerosos ao produtor. Outra medida de controle tem sido a rotação de culturas, porém, em geral, representa uma alternativa anti-econômica<sup>3</sup>.

Sendo assim, a compreensão dos mais variados mecanismos moleculares da soja em resposta a este patógeno, a partir da identificação de genes ativados e reprimidos na sua presença, através da análise do perfil transcricional, deverá auxiliar no desenvolvimento de novas alternativas de controle e de resistência a este nematóide. O objetivo principal deste estudo é a caracterização do perfil transcricional da soja ao longo da interação compatível e incompatível com *P. brachyurus*, a fim de identificar genes diferencialmente expressos.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Os genótipos TMG 115 RR e BRSGO Chapadões, suscetível e resistente, respectivamente, à infecção pelo nematóide *Pratylenchus brachyurus* foram submetidos à inoculação do patógeno. Para os diferentes períodos de tratamento, 24, 48, 96 e 192 horas após a inoculação (hpi) foram aplicados 4mL de larvas juvenis (J2) a 125 indivíduos/mL. Os tratamentos foram conduzidos com três repetições cada uma com três plantas. Para a obtenção do transcriptoma e posterior aplicação do método RNA-Seq, o sistema radicular foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

Após a avaliação da qualidade, por eletroforese em gel de agarose, as amostras de RNA total foram sequenciadas pela plataforma *Genome Analyzer* (Illumina), e posteriormente, analisadas no laboratório de bioinformática e Biotecnologia Vegetal da Embrapa/Soja em conjunto com o laboratório de Genômica e Expressão da Unicamp.

A partir dos dados de RNA-seq, seguiu-se a montagem do transcriptoma e análise *in silico*. Os *reads* gerados no sequenciamento foram filtrados para excluir: sequências referentes aos adaptadores da plataforma, *reads* de baixa qualidade e altamente-repetitivos. Os *reads* gerados foram alinhados contra os 73.320 transcritos preditos no genoma da soja, disponível no Banco de Dados Phytozome utilizando o software Short Oligonucleotide Alignment Program 2 (SOAP2). Somente os contigs e sequências únicas com mapeamento único nos transcritos foram utilizados na análise. O nível de expressão foi calculado com base no número de *reads* por kilobase por milhão de *reads* mapeada (RPKM). Os resultados destes alinhamentos e de expressão estão disponíveis na base de dados Gensoja (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/soybean>).

Para a identificação de transcritos diferencialmente expressos, foi realizada a comparação do nível de expressão do transcrito, dado pelos valores de RPKM, entre os tratamentos inoculado e controle, dentro do mesmo tempo para cada genótipo. Foram usados dois pacotes estatísticos nesta etapa: edgeR e baySeq. Os dados de fold-change de todas as

bibliotecas foram plotados juntos utilizando o software R 3.0.1 para a observação da distribuição dos mesmos, e estabelecimento de pontos de corte para os genes diferenciais. Somente foram considerados genes diferenciais aqueles que apresentaram confiança ao nível de significância de 1% (p) e com fold-change de RPKM < -2 ou >2.

Para obter uma visão geral dos processos que foram ativados e/ou reprimidos durante os estágios iniciais da interação soja-nematóide compatível e incompatível, foi realizada a classificação dos genes diferencialmente expressos utilizando o software MapMan<sup>5</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento do transcriptoma dos genótipos resistente e suscetível gerou um total de 115 e 142 milhões de *single-end reads*, respectivamente. Após as etapas iniciais de filtragem, esse número foi representado por 230.566.264 *single-end reads*. Desse total, 67,1% e 68,1% dos *reads* dos genótipos TMG115 e Chapadões, respectivamente, tiveram um único mapeamento, quando alinhados ao conjunto de transcritos da soja (73.320 sequências). A tabela 1 apresenta o número de sequências e as estatísticas de mapeamento.

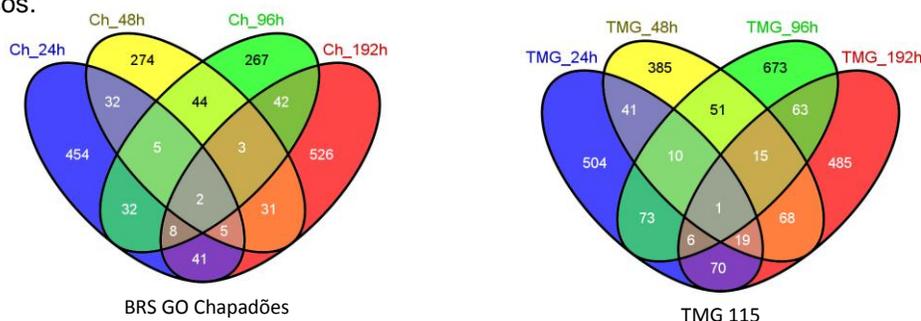
Um total de 1.766 e 2.464 GDE foram identificados nos tratamentos com BRSGO Chapadões e TMG 115 RR. Para cada biblioteca de BRSGO Chapadões foram observados 579 genes em 24h, 396 genes em 48h, 403 genes em 96h e 658 genes em 192h. Para cada biblioteca de TMG 115 RR foram observados 724 genes em 24h, 590 genes em 48h, 892 genes em 96h e 727 genes em 192h, podendo ser redundantes entre as bibliotecas. As principais categorias funcionais identificadas baseadas na classificação de Ontologias foram resposta ao estresse, metabolismo secundário e fatores de transcrição.

A comparação entre os genes diferencialmente expressos presentes em cada tempo está elucidado nos diagramas de Venn, onde é possível observar os genes exclusivos e comuns para os tempos de cada genótipo (Figura 1).

**Tabela 1:** Informação sobre os dados iniciais do sequenciamento das bibliotecas para os dois genótipos. Os dados estão apresentados em relação aos tempos/tratamento. O número de reads que tiveram mapeamento único nos transcritos da soja estão marcados em negrito "mapeamento único". A coluna "mapeamento múltiplo" indica o total de *reads* descartados por apresentarem alinhamento em mais de um modelo gênico.

Genótipo	Tempo (hpi)	Tratamento ( <i>Bibliotecas</i> )	Total de <i>reads</i> (após filtragem)	Mapeamento único	Mapeamento múltiplo	Não mapeados
BRSGO Chapadões	24h	Controle	18.707.710	<b>12.708.358</b>	1.548.882	4.450.470
		Tratado	7.139.260	<b>4.863.785</b>	674.071	1.601.404
	48h	Controle	17.172.648	<b>12.631.603</b>	1.026.363	3.514.682
		Tratado	12.021.053	<b>8.539.051</b>	912.898	2.569.104
	96h	Controle	16.100.977	<b>11.475.527</b>	1.259.445	3.366.005
		Tratado	8.784.525	<b>6.369.611</b>	584.722	1.830.192
192h	Controle	20.347.428	<b>14.741.615</b>	1.261.386	4.344.427	
	Tratado	15.285.916	<b>11.397.277</b>	828.982	3.059.657	
TMG 115RR	24h	Controle	18.631.148	<b>11.601.373</b>	1.483.958	5.545.817
		Tratado	19.633.782	<b>14.111.016</b>	1.381.084	4.141.682
	48h	Controle	16.272.332	<b>11.630.497</b>	1.183.417	3.458.418
		Tratado	19.212.113	<b>14.253.992</b>	1.197.798	3.760.323
	96h	Controle	19.450.830	<b>14.415.552</b>	1.060.676	3.974.602
		Tratado	14.586.501	<b>10.973.642</b>	734.796	2.878.063
192h	Controle	15.894.344	<b>11.257.576</b>	821.491	3.815.277	

**Figura1:** Diagrama de Venn gerado pelo software Venny para as 4 bibliotecas (24h, 48h, 96h e 192h) de cada genótipo, BRSGO Chapadões (Ch) e TMG115RR (TMG), a partir dos genes diferencialmente expressos.



A partir da comparação entre os dois genótipos, foram observados 2 GDE exclusivos para o genótipo resistente, um codificando para uma proteína Mlo e outra para uma proteína desconhecida. Esses genes podem estar potencialmente envolvidos com a resposta de defesa ao patógeno, já que Mlo foi descrita na resistência ao ódio em cevada<sup>6</sup>.

## CONCLUSÕES

Até o momento, a caracterização do transcriptoma de genótipos de soja nos estágios iniciais de interação compatível e incompatível com o nematóide *Pratylenchus brachyurus*, possibilitou a obtenção de 1.766 e 2.464 GDE, identificados nos genótipos resistente e suscetível, respectivamente, sendo que dois genes exclusivos ao genótipo resistente. Entre os GDE, as principais categorias funcionais observadas foram aquelas envolvidas na resposta a estresse. Espera-se ao final deste estudo, que tais informações sejam importantes para a identificação de genes associados nas respostas precoces e intermediárias de defesa das plantas de soja a este patógeno, quanto para possíveis alvos ao melhoramento da resistência da soja ao nematóide.

## REFERÊNCIAS

- (1) BONATO, E. R. **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000, 254p.
- (2) DIAS, W. P; GARCIA, A; SILVA, J. F. V; CARNEIRO, G. E. de S. Nematóides de soja: identificação e controle. **Embrapa: Circular Técnica**, **76**. ed.1, 2010.
- (3) GOULART, A. M. C; **Aspectos Gerais sobre Nematóides-das-lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina – DF: Embrapa Cerrados. 2008. 30 p.
- (4) RIBEIRO, N. R; DIAS, W.P; SANTOS, J. M. Distribuição de Fitonematóides em regiões produtoras de soja do estado de Mato Grosso. **Boletim de Pesquisa de Soja: Fundação MT**. n.14, p.289- 296, 2010.
- (5) USADEL, B., NAGEL, A., THIMM, O. Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. **Plant Physiology**.v.138, p.1195–1204, 2005.
- (6) DEVOTO, A.; PIFFANELLI, P.; NILSSON, I; WALLIN, E.; PANSTRUGA, R. Topology, Subcellular Localization, and Sequence Diversity of the Mlo Family in Plants. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 49, pp. 34993–35004, 1999.