



THALITA MASSARO MALHEIROS FERREIRA

***Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) COMO POTENCIAL
PLANTA MODELO PARA VALIDAÇÃO DE
PROMOTORES/GENES RESPONSIVOS AO ESTRESSE
SALINO**

**LAVRAS-MG
2020**

THALITA MASSARO MALHEIROS FERREIRA

***Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) COMO POTENCIAL PLANTA MODELO
PARA VALIDAÇÃO DE PROMOTORES/GENES RESPONSIVOS AO ESTRESSE
SALINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Junior
Orientador

Prof. Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa
Coorientador

**LAVRAS-MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ferreira, Thalita Massaro Malheiros.

Setaria viridis (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) como potencial
planta modelo para validação de promotores/genes responsivos ao
estresse salino. / Thalita Massaro Malheiros Ferreira. - 2020.
116 p. : il.

Orientador(a): Manoel Teixeira Souza Júnior.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Estresse abiótico. 2. Palma de óleo. 3. Planta modelo. I.
Souza Júnior, Manoel Teixeira. . II. *Setaria viridis* (L.) P. Beauv.
(acesso A10.1) como potencial planta modelo para validação de
promotores/genes responsivos ao estresse salino.

THALITA MASSARO MALHEIROS FERREIRA

***Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) COMO POTENCIAL PLANTA MODELO
PARA VALIDAÇÃO DE PROMOTORES/GENES RESPONSIVOS AO ESTRESSE
SALINO**

***Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (access A10.1) AS A POTENTIAL MODEL PLANT FOR
VALIDATION OF SALINE STRESS RESPONSIVE GENES / PROMOTERS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de fevereiro de 2020.

Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior	EMBRAPA - Agroenergia
Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa	EMBRAPA – Meio Norte
Dr. Betânia Ferraz Quirino	EMBRAPA - Agroenergia

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Junior
Orientador

Prof. Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa
Coorientador

**LAVRAS-MG
2020**

Aos meus verdadeiros amigos, que deixaram mais leve e alegre esta jornada,

Ofereço!

A toda a minha família e, principalmente, à minha mãe e aos meus avós, pelos exemplos de seres humanos que são,

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a toda a minha família, principalmente aos meus pais e avós, que estão sempre ao meu lado, me apoiando, e não só querendo meu sucesso profissional e minha felicidade, mas também investindo com o que podem para que eu alcance meus sonhos. Agradeço fortemente, também, aos meus amigos (amigos de verdade) que estão comigo nos bons e maus momentos e que com certeza também torcem pela minha felicidade. Agradeço em particular à minha mãe, Cristiane, que é e sempre será minha completa base emocional, minha melhor amiga, que está sempre comigo me apoiando e me ajudando a trilhar os melhores caminhos possíveis. Agradeço, também em particular, ao meu avô Lázaro e à minha avó Adelina, nos quais me espelho fortemente. São símbolos de luta, perseverança, fé, cuidado, afeto e, juntamente com minha mãe, são meu tudo.

Agradeço ao meu tio Márcio, com o qual aprendi a amar profundamente, com o passar dos anos. Agradeço ao meu padrinho, Marlon, uma das inspirações para a escolha do meu curso, meu gosto musical, e que é meu símbolo de irmão mais velho. Todos também fazem parte da minha história. Todos juntos são pedaços lindos do meu mundo, são minha família. A melhor família que eu poderia ter tido! Agradeço ao meu pai Humberto e a toda a minha família paterna, que também foram grandes inspirações para que pudesse seguir em frente. Destaco ainda, dentre a família paterna, Graziela, Eduardo e Klaus, símbolos de amor verdadeiro. Alexander, Luiza, Jade, Caroline, Luana, Deborah, Djavan, Thiago, entre outros, foram, durante esse tempo, peças-chave para o meu bem-estar e alívio mental. Juntos esquecemos os deveres e apenas nos divertimos. Ter essas pessoas na minha jornada pessoal não tem preço! Agradeço a todos os professores de toda a minha vida acadêmica, que formaram degraus para que eu conseguisse subir onde subi.

Gostaria de agradecer ainda a todos os colegas de pesquisa da Embrapa Agroenergia, em especial: à Cecília, à Vivianny, à Letícia, ao Elias, ao Calil, à Fernanda, ao Bruno, ao Ítalo, ao Thalliton e aos meus orientadores Carlos Antônio e Manoel Teixeira, que me ajudaram e acreditaram no meu desempenho desde o início. Sem todas essas pessoas em minha vida seria difícil chegar até onde cheguei, em uma universidade federal com professores excelentes que fazem parte desse crescimento acadêmico diário, mostrando-me o caminho para que eu chegue onde eu quiser. Acredito que estou rodeada pelo amor de pessoas queridas que só me desejam o bem, para as quais eu também desejo o melhor!

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realização do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

“A educação é um processo social, é desenvolvimento. Não é a preparação para a vida, é a própria vida”. (John Dewey)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo o teste de duas hipóteses, que foram: a) A *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) é intolerante a estresse salino, e consequentemente pode ser utilizada como planta modelo para validação de genes candidatos a conferir tolerância à salinidade; e b) O perfil de expressão de genes de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) responsivos a estresse de salinidade, observado mediante análise *in silico* de expressão diferencial, é igual ao observado *in vivo*. Para testar a primeira hipótese, foi realizada uma caracterização da resposta morfofisiológica de *S. viridis* (A10.1) a diferentes concentrações de NaCl tanto na germinação das sementes e desenvolvimento inicial, quanto na fase vegetativa. Os resultados alcançados permitem confirmar a primeira hipótese; no entanto, além de se observar que a germinação das sementes foi pouco afetada pela salinidade no substrato, enquanto o desenvolvimento inicial das mudas foi altamente prejudicado; também foi observado que na fase vegetativa a intolerância ao sal era mais evidente quando a condutividade elétrica é superior a aproximadamente 15 dSm⁻¹ (NaCl > 0,4 g / 100 g de substrato). Para testar a segunda hipótese, foi realizada a prospecção e anotação de genes responsivos a estresse de salinidade em dendê, e caracterização do perfil de expressão gênica deste mediante emprego de qPCR. Dados de RNA-seq, que fazem parte do Banco de Dados “Sal da Terra” da Embrapa Agroenergia, e que foram obtidos a partir de amostras de folhas de plantas com zero, cinco e doze dias de estresse salino, foram submetidos à análise utilizando o módulo de transcrito da plataforma OmicsBox. Para a seleção de genes responsivos ao estresse salino, foram aplicados os seguintes critérios: FDR ≤ 0.01 e logFC ≥ 5. Um total de 33 genes foi selecionado quando comparando plantas no dia zero e no dia cinco de estresse, e 10 genes quando comparando plantas no dia zero e no dia doze de estresse. Seis genes eram comuns a ambos os grupos, e por isso foram selecionados para anotação estrutural e funcional. Destes, três genes foram selecionados para caracterização do perfil de expressão *in vivo*, sendo que em nenhum deles foi observada coincidência nos perfis de expressão *in silico* e *in vivo*.

Palavras-chave: Estresse Abiótico. Palma de óleo. Salinidade. Fenômica. Transcritômica.

ABSTRACT

This study aimed to test two hypotheses, which were: a) *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (accession A10.1) is not tolerant to salt stress, and therefore can be used as a model plant for validation of candidate genes to confer tolerance to salinity, and b) the expression profile of salinity stress-responsive genes from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), observed by *in silico* differential expression analysis, is the same as that observed *in vivo*. To test the first hypothesis, we performed the characterization of the morphophysiological response of *S. viridis* (A10.1) to different concentrations of NaCl in seed germination and initial development, as well as in the vegetative phase. The results achieved allow confirming the first hypothesis; however, besides seen that the seed germination was little affected by the salinity in the substrate, while the initial seedling development was highly impaired; it was also observed that in the vegetative phase the intolerance to salt was more evident when the electrical conductivity is greater than approximately 15 dSm⁻¹ (NaCl > 0.4 g / 100 g substrate). To test the second hypothesis, we prospected and annotated genes responsive to salinity stress in the oil palm genome and then characterized its expression profile through qPCR analysis. RNA-seq data, which are part of Embrapa Agroenergy's "Salt of the Earth" Database, and which were obtained from leaf samples of plants with zero, five and twelve days of salt stress, were submitted to analysis using the OmicsBox platform transcript module. For the selection of saline stress-responsive genes, the following criteria were applied: FDR ≤ 0.01 and logFC ≥ 5. A total of 33 genes were selected when comparing plants at zero and five days of stress and 10 genes when comparing plants at zero and 12 days of stress. Six genes were common to both groups and were therefore selected for structural and functional annotation. From these, three genes were selected for characterization of the expression profile *in vivo*; none of them had coincidence *in silico* and *in vivo* expression profiles.

Keywords: Abiotic Stress. Oil palm. Salinity. Phenomics. Transcriptomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação esquemática dos estresses sob condições altamente salinas e as respostas correspondentes das plantas para sobrevivência a tais condições.....	26
Figura 2	- Modelo das vias SOS em resposta ao estresse salino	29
Figura 3	- Estruturação da dissertação (capítulos).....	36
Figura 4	- Condutividade elétrica do substrato de germinação de sementes de <i>S. viridis</i> em função da concentração de NaCl	51
Figura 5	- Percentagem de germinação de sementes de <i>Setaria viridis</i> em função da concentração de NaCl no substrato.....	52
Figura 6	- Área foliar de plântulas de <i>Setaria viridis</i> em função da concentração de NaCl no substrato aos nove dias após o semeio	53
Figura 7	- Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de germinação sobre o aspecto visual da parte aérea de plântulas de <i>S. viridis</i> aos 9 dias após o semeio.....	54
Figura 8	- Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre a fluorescência máxima (Fm) em plântulas de <i>S. viridis</i> aos 9 dias após o semeio.....	55
Figura 9	- Efeito visual do aumento da concentração de NaCl no substrato de germinação sobre o sistema radicular de plântulas de <i>S. viridis</i> aos nove dias após o semeio.....	56
Figura 10	- Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de germinação sobre as variáveis morfológicas em raízes de plântulas de <i>S. viridis</i>	57
Figura 11	- Efeitos do aumento da concentração de NaCl nas variáveis de condutividade elétrica (A) e o potencial hídrico (B) do extrato de saturação do substrato de cultivo das plantas de <i>Setaria viridis</i>	59
Figura 12	- Taxa diária de perda de água em função de diferentes concentrações de NaCl no substrato de cultivo	60
Figura 13	- Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre o aspecto visual de plantas de <i>Setaria viridis</i> na fase vegetativa.....	61
Figura 14	- Mudanças nas variáveis de trocas gasosas em plantas de <i>Setaria viridis</i> em função de concentrações crescentes de NaCl no substrato de cultivo.....	62
Figura 15	- Efeitos do aumento de concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre as variáveis derivadas da técnica de fluorescência da clorofila (método do pulso de saturação)	63
Figura 16	- Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre o índice de clorofila (A), o índice de refletância dos carotenoides (B) e índice de refletância fotoquímica (C) em plantas de setária na fase vegetativa.....	64

Figura 17	- Efeitos do aumento de concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre a biomassa fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de <i>Setária viridis</i>	65
Figura 18	- Distribuição dos grupos de contagem	86
Figura 19	- Quantificação das sequências de alta qualidade das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse) contra o genoma de referência de <i>Elaeis guineensis</i> (EG5) anotado e disponível no NCBI em porcentagem	87
Figura 20	- MDS-Plot: Escala multidimensional relativa à separação do grupo controle e do grupo estressado com diferentes concentrações de NaCl coletados com 5 e com 12 dias	89
Figura 21	- Volcano-Plot: Gráfico de dispersão relativo aos genes up-regulated e down-regulated estressados aos 5 e aos 12 dias	90
Figura 22	- MA-Plot: Gráfico relativo à representação dos genes up-regulated referente ao estresse de 5 e 12 dias	91
Figura 23	- Mapa de calor da associação entre amostras de folha de dendê controle e amostras de folha de dendê estressadas com 5 e com 12 dias.....	92
Figura 24	- Perfis de expressão in silico e in vivo dos três genes selecionados para análise por qPCR.....	97

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Definição de salinidade, sodicidade e alcanidade, segundo o Laboratório de Salinidade da USDA (adaptado de MUNNS, 2005) 22
- Quadro 2 - Sequências dos três genes selecionados para análise por qPCR, e dos respectivos pares de primers utilizados 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Amostras provenientes do sequenciamento pair-end (controle, estressadas com 5 e 12 dias)	78
Tabela 2	- Análise de qualidade das sequências das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse)	83
Tabela 3	- Mapeamento das sequências de alta qualidade das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse) contra o genoma de referência de <i>Elaeis guineensis</i> (EG5) anotado e disponível no NCBI.....	84
Tabela 4	- Quantificação das sequências de alta qualidade das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse) contra o genoma de referência de <i>Elaeis guineensis</i> (EG5) anotado e disponível no NCBI.....	85
Tabela 5	- Dados estatísticos gerados a partir da análise de expressão diferencial utilizando o software edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) para os genes up-regulated selecionados, mediante uso dos critérios $FDR \leq 0.01$ e $\log FC \geq 5$, e que estavam presentes quando comparando as plantas controle vs. estressadas por cinco dias, e também quando comparando as plantas controle vs. estressadas por 12 dias	93
Tabela 6	- Anotação estrutural e funcional dos genes up-regulated selecionados, mediante uso dos critérios $FDR \leq 0.01$ e $\log FC \geq 5$, e que estavam presentes quando comparando as plantas controle vs. estressadas por cinco dias, e também quando comparando as plantas	94

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

APX	Peroxidase do ascorbato
CAT	Catalase
dS m ⁻¹	Decisiemens por metro
EROs	Espécies reativas do oxigênio
GR	Redutase da glutatona
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogeniônico da pasta saturada do solo
pHs	pH da pasta saturada do solo
POD	Peroxidase
SOD	Dismutase do superóxido
SOS	<i>Salt Overly Sensitive</i>
Ψ_{π}	Potencial osmótico

LISTA DE SIGLAS

CC	Capacidade de Campo
CE	Condutividade elétrica
CEe	Condutividade elétrica do extrato de saturação da solução
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
OS	Peso Seco
PF	Peso Fresco
PST	Porcentagem de sódio trocável

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	A salinização dos solos como fator limitante na superação do maior desafio da agricultura mundial no século 21	22
2.2	Os efeitos da salinidade na planta	24
2.3	Tolerância à Salinidade – Mecanismos de Tolerância.....	25
2.4	Uso de genes de tolerância à salinidade	27
2.5	Prospecção e Validação de Promotores / Genes Responsivos a Estresse Salino	30
2.6	Caracterização das respostas morfofisiológicas de <i>Setaria viridis</i> L. (Acesso A10.1) ao estresse de salinidade mediante emprego da fenômica	33
3	HIPÓTESES e OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.1	Hipóteses	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	Respostas morfofisiológicas de <i>Setaria viridis</i> (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) a diferentes concentrações de NaCl durante a germinação de sementes, no desenvolvimento inicial das plântulas, e na fase vegetativa de crescimento das plantas	43
	Morphophysiological responses of <i>Setaria viridis</i> (L.) P. Beauv. (accession A10.1) to different NaCl concentrations during seed germination, the initial development of the seedling, and in the vegetative development phase.....	44
1	INTRODUÇÃO	45
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1	Germinação das sementes e crescimento inicial das plântulas sob estresse salino.....	47
2.2	Submissão das plantas de <i>Setaria viridis</i> acesso A10.1 ao estresse salino.....	48
2.3	Delineamento experimental e análise dos dados.....	51
3	RESULTADOS	52
3.1	Efeito do estresse salino sobre a germinação de sementes e crescimento das plântulas de <i>Setaria viridis</i>	52
3.2	Efeitos do estresse salino sobre plantas de <i>Setaria viridis</i> acesso A10.1 no segundo estágio de desenvolvimento	59
4	DISCUSSÃO	67
4.1	Efeitos do estresse salino sobre a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas do acesso A10.1 de <i>Setaria viridis</i>	67

4.2	Efeitos do estresse salino sobre o segundo estágio de desenvolvimento de <i>Setaria viridis</i> acesso A10.1	68
5	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	Prospecção e anotação de genes responsivos a estresse de salinidade em dendê (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) e caracterização do perfil de expressão gênica mediante emprego de qPCR.....	75
	Prospection and annotation of genes responsive to salinity stress in oil palm (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.), and characterization of gene expression profile using qPCR.....	76
1	INTRODUÇÃO	77
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1	Análise de expressão diferencial in silico e prospecção de genes responsivos à salinidade	79
2.1.1	Reference Based Transcriptomics Workflow - Pré-processamento FASTQ, Verificação de qualidade FASTQ, Alinhamento de RNA-Seq e Geração de Tabela de Contagem (BAM + GFF).....	80
2.1.2	Reference Based Transcriptomics Workflow - Análise da expressão diferencial ..	80
2.2	Seleção e anotação estrutural e funcional de genes responsivos à salinidade.....	81
2.3	Análise do perfil de expressão diferencial in vivo dos genes responsivos à salinidade	81
3	RESULTADOS	83
3.1	Pré-processamento FASTQ, Verificação de qualidade FASTQ, Alinhamento de RNA-Seq e Geração de Tabela de Contagem (BAM + GFF).....	83
3.2	Análise da expressão diferencial, seleção e anotação de genes responsivos a estresse salino	88
3.3	Análise do perfil de expressão in vivo dos genes responsivos a estresse salino.....	96
4	DISCUSSÃO	99
4.1	Análise de expressão diferencial, prospecção e anotação de genes responsivos à salinidade	99
4.2	Análise do perfil de expressão in vivo de genes responsivos a estresse salino.....	102
5	CONCLUSÕES.....	103
	REFERÊNCIAS.....	104
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A salinidade é um dos mais importantes estresses abióticos que afetam negativamente a agricultura. O nível de dano depende da espécie vegetal, do solo e da qualidade da água utilizada para irrigação (QADIR *et al.*, 2014). A quantidade elevada de sal no solo afeta a capacidade das plantas de absorverem água e impacta negativamente a taxa de crescimento da maioria das culturas (DEINLEIN *et al.*, 2014).

Por definição, a salinidade é referida como a concentração de sais inorgânicos que se encontram dissolvidos na solução do solo e/ou na água (HU, Y; SCHMIDHALTER, 2004). Os sais inorgânicos dissolvidos são constituídos por cátions e ânions. Os principais exemplos de cátions encontrados na solução do solo são: sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e potássio (K^+); e os principais ânions são: cloro (Cl^-), sulfato (SO_4^{2-}), bicarbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}), e nitrato (NO_3^-). Em solos e água altamente salinos, são encontrados outros elementos como o boro (B), o estrôncio (Sr^{2+}), o molibdênio (Mo), o dióxido de silício (SiO_2), o bário (Ba^{2+}) e o alumínio (Al^{3+}) (HU, Y; SCHMIDHALTER, 2004).

A desestruturação do solo induzida pelo sal é comum em regiões áridas e semiáridas, onde a precipitação é baixa demais para a percolação da água da chuva através do solo e a irrigação é praticada em sistemas de drenagem natural ou artificial (QADIR *et al.*, 2014). O processo de salinização dos solos pode ocorrer de duas maneiras, uma delas por causas naturais (salinidade primária) ou devido a ações antrópicas (salinidade secundária). A salinidade primária acontece em resposta ao intemperismo e depósito de sais oceânicos; a salinidade secundária está relacionada ao desmatamento e irrigação (PARIHAR *et al.*, 2015). A salinidade secundária ocorre com frequência nas regiões áridas e semiáridas (PITMAN; LÄUCHLI, 2002). Globalmente, estima-se que dos 230 milhões de hectares de solos irrigados, 19,5% são afetados pela salinidade (FAO, 2019).

Evolutivamente as plantas distinguem-se em dois grupos quanto à tolerância à salinidade: as halófitas e as glicófitas (DIAS, 2010). As halófitas são descritas como plantas que apresentam a capacidade de crescer e completar seu ciclo de vida em ambientes com alta salinidade, enquanto as glicófitas não apresentam essa capacidade (DIAS, 2010). A maioria das espécies vegetais é descrita como glicófitas, mas é nas halófitas que se encontra uma fonte promissora de genes para tolerância à salinidade (GREENWAY; MUNNS, 1980; SLAMA *et al.*, 2015).

Estudos morfofisiológicos de caracterização da resposta de plantas diante do estresse salino, com um robusto protocolo de salinização, são eficientes para compreender a resposta que determinado vegetal apresenta à salinidade. Avaliar as respostas morfofisiológicas de plantas a estresses abióticos, como a salinidade, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos de tolerância e/ou suscetibilidade que uma determinada espécie apresenta. Neste contexto, a fenômica surge como uma área emergente da ciência, imprescindível para a caracterização de fenótipos podendo ser inter-relacionada com outras áreas como, por exemplo, a metabolômica e a transcritômica (RAHMAN *et al.*, 2015), fornecendo *insights* dos mecanismos envolvidos na resposta da planta à salinidade.

As técnicas modernas de fenotipagem, agrupadas sob o conceito de fenômica, são poderosas ferramentas em estudos visando avaliar o grau de suscetibilidade de uma espécie vegetal a um ou mais estresses, sejam eles abióticos ou bióticos, ou à combinação destes, o que pode contribuir para estratégias mais eficazes de prospecção e validação de genes e promotores responsivos ao estresse salino (SANTOS, 2017). Buscam-se avaliações rápidas, que possam ser aplicadas em larga escala, com métodos não destrutivos, realizados muitas vezes no campo, baseados em imagens geradas por técnicas espectroscópicas em diferentes regiões do espectro eletromagnético (WALTER; LIEBISCH; HUND, 2015).

A *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. tem sido proposta como planta modelo para estudo de genômica funcional que visa prospectar e validar genes/alelos para uso em plantas C4, tais como milho, cana-de-açúcar e sorgo. Esta espécie vegetal apresenta aspectos biológicos favoráveis ao seu uso como planta modelo, cabendo citar o seu ciclo de vida curto, um genoma pequeno e já sequenciado e anotado, um sistema de cultura de tecidos e transformação genética já validado, propagação por sementes, entre outros. A *S. viridis* pertence à ordem *Cyperales*, ao gênero *Setaria* e à família *poaceae* (Gramíneas). É uma planta diploide ($2n = 2x = 18$), com um genoma relativamente pequeno, chegando a aproximadamente 510 Mb (BRUTNELL *et al.*, 2010).

Os objetivos desse trabalho foram: a) determinar se o acesso A10.1 de *S. viridis* é intolerante ao estresse de salinidade, podendo assim ser usado como planta modelo para validação de genes e promotores responsivos ao estresse salino; b) determinar se o perfil de expressão *in vivo* de um gene de dendê responsivo à salinidade (obtido mediante emprego da técnica de PCR quantitativo) é similar ao perfil de expressão observado *in silico* (obtido mediante emprego da técnica de RNA-Seq).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A salinização dos solos como fator limitante na superação do maior desafio da agricultura mundial no século 21

O maior desafio da agricultura mundial nesta primeira metade do século 21 é promover um aumento de 70% na produção de alimentos, tendo como base os dias atuais, para atender a demanda de uma população mundial que deve chegar a nove bilhões de pessoas em 2050 (FAO, 2019). Este desafio precisa ser enfrentado em um novo contexto, até então não confrontado pela agricultura, que é o de mudanças climáticas. Tais mudanças referem-se à variação do clima em escala global ou em escala regional ao longo do tempo (NASA, 2017).

É provável que eventos climáticos extremos se tornem mais graves e mais frequentes, aumentando ainda mais as limitações para a produção de biomassa devido a estresses abióticos e bióticos. A adaptação a essas mudanças necessariamente terá que passar pelo desenvolvimento de um setor agrícola mais resiliente a essas novas condições, o chamado "sistema alimentar climático inteligente" (WHEELER; VON BRAUN, 2013). Um dos estresses abióticos que mais ameaça esse equilíbrio é a salinidade. Segundo a FAO (2015), não existem estatísticas recentes precisas sobre a extensão global desse problema, embora existam dados que mostram a ocorrência de solos salinizados em mais de 100 países.

A salinidade dos solos é um dos estresses abióticos mais limitantes no desenvolvimento das culturas irrigadas, considerando-se que cerca de 20% de área cultivada é afetada pelo sal (GUPTA; HUANG, 2014). Dos atuais 230 milhões de hectares de terra irrigada 45 milhões encontram-se afetados pelo sal (FAO, 2015). Ribeiro *et al.* (2009) afirmam ainda que esse problema é um assunto discutido em vários países, principalmente nos que apresentam regiões áridas e semiáridas. Quanto ao Brasil, os solos salinos e sódicos são aqueles que ocorrem na região do Pantanal mato-grossense e com predomínio na região semiárida do Nordeste (RIBEIRO; FREIRE; MONTENEGRO, 2003). A definição de salinidade, sodicidade e alcalinidade, bem como a descrição de seus efeitos sobre os tecidos vegetais estão no Quadro 1, a seguir (MUNNS, 2005).

Quadro 1 - Definição de salinidade, sodicidade e alcanidade, segundo o Laboratório de Salinidade da USDA (adaptado de MUNNS, 2005)

Termo	Definição	Descrição	Efeitos no crescimento da planta	Comentários
Salinidade	Solos salinos têm uma alta concentração de sais solúveis. Eles são classificados como salinos quando o C _{Ee} , é $\geq 4 \text{ dSm}^{-1}$.	Esta definição de salinidade deriva da C _{Ee} que fornecerá a redução da maioria da colheita. Entretanto, muitas colheitas são afetadas por um C _{Ee} $< 4 \text{ dSm}^{-1}$.	Componentes osmóticos e salinos específicos inibem o crescimento de raiz e broto.	C _{Ee} é a condutividade elétrica de estratos, e reflete a concentração de sal em solos saturados. A condutividade de 4 dSm^{-1} é equivalente a 40 mM de NaCl.
Sodicidade	Solos sódicos têm uma baixa concentração de sais solúveis, mas uma alta porcentagem de Na ⁺ permutável (ESP). Eles são classificados como sódicos quando o ESP é ≥ 15 .	Esta definição de sodicidade deriva do ESP que causa degradação da estrutura de solos argilosos, causados pelo deslocamento de Na ⁺ e cátions divalentes ligados por cargas negativas em partículas de argila.	A estrutura de solos pobres inibe o crescimento de raízes.	Altos ESP separam partículas de argila. O solo oligotrófico drenado, quando molhado, torna-se alagado. Este também se torna endurecido quando seco.
Alcanidade	Solos alcalinos são um tipo de solo sódico com alto pH. Eles são definidos como tendo um ESP ≥ 15 com pH de 8,5-10.	O alto pH é causado pelo sal de carbonato em material de origem.	Alto pH afeta a disponibilidade de nutrientes.	

Fonte: Adaptado de Munns (2005).

O problema do excesso de sal no solo enfrentado pela agricultura provém da crescente escassez de recursos hídricos de boa qualidade, levando produtores a utilizar água salobra para irrigação das culturas (DIAS, 2010). Partindo deste pressuposto, a salinização primária ou natural do solo é o processo de acúmulo de sais (sódio, potássio, magnésio, cálcio, cloreto, sulfato, carbonato e bicarbonato) resultante do alto teor de sal nas matérias-primas, proveniente de inundações, drenagem natural deficiente; a secundária ou induzida pelo homem é resultante de práticas inapropriadas de antropização dos solos (adubação, fertilizantes inorgânicos, irrigação com água salina, lâmina insuficiente de água de irrigação e/ou drenagem insuficiente) (FAO, 2015).

Para avaliar a salinidade, geralmente são empregadas medidas de condutividade elétrica (CE), total de sólidos dissolvidos (TSD), potencial osmótico ($\Psi\pi$) e condutividade

elétrica do extrato de saturação da solução (CEe). Com base nas propriedades químicas do solo como: CEe, porcentagem de sódio trocável (PST) e pH da pasta saturada do solo (pHs), um solo salino é definido quando $CEe > 4 \text{ dSm}^{-1}$, $PST < 15\%$ e $pH < 8,5$ (HU, Y; SCHMIDHALTER, 2004).

Solos afetados pelo sal incluem tanto aqueles onde a condutividade elétrica do solo excede 4 dSm^{-1} a 25°C , como aqueles onde a porcentagem de sódio trocável excede 6 dSm^{-1} - solos sodificados (PEDROTTI, 2015). A salinidade é a situação de excesso de sais solúveis nas camadas superficiais do solo, afetando, de alguma maneira, o desenvolvimento vegetal (RIBEIRO *et al.*, 2009). Uma condutividade elétrica de 4 dSm^{-1} corresponde a aproximadamente 40 mM de NaCl, gerando uma pressão osmótica de aproximadamente 0,2 MPa, o que por consequência promove diversos problemas fisiológicos em plantas sensíveis (MUNNS; TESTER, 2008).

2.2 Os efeitos da salinidade na planta

Os sais exercem efeitos de forma direta ou indireta, lenta ou abrupta, total ou parcial sobre o desenvolvimento e produção das espécies vegetais (SERTÃO, 2005). Nos solos agricultáveis, tais efeitos estão relacionados às respostas das plantas, tanto na fisiologia quanto no metabolismo, sendo o efeito prejudicial observado em todos os níveis de desenvolvimento da planta, provocando a redução ou perda de produtividade. O estresse salino afeta todos os principais processos do vegetal, tais como germinação, crescimento, pigmentos fotossintéticos e fotossíntese, absorção de água, desequilíbrio de nutrientes, estresse oxidativo e, por consequência, o rendimento (PARIHAR *et al.*, 2015).

As diversas mudanças relacionadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas dependem da quantidade de sal e do tempo de exposição (GUPTA; HUANG, 2014), o que pode reduzir diversos aspectos da produção. A inibição do crescimento e da produção vegetal se deve à redução no potencial osmótico da solução do solo, provocado pelo excesso de sais e/ou pelo efeito tóxico dos mesmos (SILVA *et al.*, 2000).

Na fase inicial do estresse, a absorção de água pela raiz diminui e a perda de água pela folha aumenta, como resultado do estresse osmótico (MUNNS, 2005). O estresse osmótico causa mudanças fisiológicas como desequilíbrios de nutrientes, diminuição da capacidade de desintoxicar espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuição das atividades fotossintéticas e abertura estomática (MUNNS; TESTER, 2008). O estresse salino na fase inicial também desencadeia um estresse iônico, e tal efeito é um dos mais prejudiciais, pois gera um acúmulo

de íons Na^+ e Cl^- nos tecidos de plantas expostas em solos com altas concentrações de NaCl (JAMES *et al.*, 2011). Além disso, após o acúmulo de Na^+ , ocorre diminuição da condutância estomática e, por consequência, da taxa de fotossíntese (MUNNS; TESTER, 2008).

2.3 Tolerância à Salinidade – Mecanismos de Tolerância

No que diz respeito à resposta das plantas ao estresse salino, estas são classificadas em dois grandes grupos, glicófitas e halófitas. A grande maioria das espécies vegetais cultivadas são glicófitas, com algumas poucas exceções. As glicófitas, que correspondem a 99% da flora do planeta, não são capazes de se desenvolver e completar seu ciclo de vida em ambientes com elevadas concentrações salinas (WILLADINO; CAMARA, 2010). As plantas halófitas sobrevivem e se reproduzem em ambientes onde a concentração de sal é de cerca de 200 mM de NaCl ou mais, e constituem cerca de 1% da flora do planeta, sendo que o efeito da salinidade sobre o crescimento varia entre as mesmas (SCHOSSLER *et al.*, 2012). Tais plantas possuem a capacidade de crescer em substratos cujo potencial hídrico oscila entre -1,0 e -2,5 MPa e, em condições extremas, a -5,0 MPa (WILLADINO; CAMARA, 2004).

As plantas ditas tolerantes à salinidade apresentam um ou mais mecanismos de tolerância. Essas características são multigênicas, portanto, as vias bioquímicas que levam a produtos ou processos que melhoram a tolerância ao sal provavelmente agem de forma sinérgica (PARIDA, 2005). As glicófitas são caracterizadas por não suportarem o déficit hídrico ocasionado pela redução do potencial osmótico e as altas taxas de íons no citoplasma. Em contrapartida, as plantas consideradas tolerantes, denominadas halófitas, são capazes de armazenar grandes quantidades de íons no citoplasma, diminuindo o efeito tóxico dos mesmos e permitindo um gradiente osmótico mais favorável para que a absorção de água pelas raízes seja mais efetiva (GUPTA; HUANG, 2014).

As diversas espécies e cultivares de plantas respondem diferentemente aos efeitos negativos da salinidade, havendo para cada uma delas um limite tolerável de salinidade que não causa redução na produtividade potencial (DIAS, 2010). A tolerância e sensibilidade à salinidade dependem, sobretudo, do tipo de sal, do método e da frequência de irrigação e das condições climáticas (RHOADES; KANDIAH; MASHALI, 2000). Os critérios para avaliar a tolerância das culturas à salinidade podem ser englobados de acordo com um dos três critérios seguintes: 1) capacidade da planta de sobreviver em solo salino; 2) rendimento da planta em meio salino e 3) produção relativa (RHICHARDS, 1954). Desse modo, as espécies vegetais

podem ser classificadas como glicófitas sensíveis e moderadamente sensíveis, halófitas moderadamente tolerantes e tolerantes.

Os diferentes níveis de tolerância além de estarem relacionados a características multigênicas, também estão relacionados a genes únicos responsáveis pela característica de interesse, ligados a mecanismos bioquímicos e moleculares que conferem a tolerância ao estresse salino, os quais estariam ausentes em plantas sensíveis (PARIHAR *et al.*, 2015). Geralmente incluem a capacidade de minimizar o acúmulo líquido de sódio e / ou íons cloreto e para selecionar potássio de um fundo de alta concentração de sódio (FLOWERS, 2004).

Resultados recentes sobre fluxos de íons mostram que a manutenção da homeostase de K^+ é essencial para as atividades enzimáticas, homeostase iônica e homeostase do pH (SHABALA; POTTOSIN, 2014). Fernandes *et al.* (2010) afirmaram que várias halófitas apresentam mecanismos de exclusão de Na^+ e Cl^- em estruturas morfológicas como, por exemplo, glândulas secretoras ou pelos vesiculares. Muitas vezes a exclusão de sal ocorre através das folhas por meio dessas glândulas para manter o nível interno de sal baixo. A exclusão pode ocorrer também através das raízes para regular o teor de sal de suas folhas ou ainda promover a abscisão de folhas velhas que acumulam consideráveis quantidades de sal (WILLADINO; CAMARA, 2014).

Para plantas expostas a diferentes concentrações de sal, os mecanismos de resposta ao estresse salino variam desde regulação antioxidante, regulação hormonal, acúmulo de solutos compatíveis, proteção osmótica, entre outros (GUPTA; HUANG, 2014). Existem ainda os mecanismos de escape, os quais envolvem reduzida atividade metabólica, levando a um estado de dormência, que evitam a exposição ao estresse. Já os mecanismos de tolerância, por sua vez, envolvem alta atividade metabólica sob pouco ou quase nenhum estresse, e baixa sob estresse severo. (WILLADINO; CAMARA, 2005). A Figura 1, a seguir, refere-se a uma representação esquemática de algumas respostas das plantas perante as altas concentrações salinas.

Figura 1 - Representação esquemática dos estresses sob condições altamente salinas e as respostas correspondentes das plantas para sobrevivência a tais condições



Fonte: adaptado de Sharma *et al.* (2016)

Acerca do supracitado pode-se afirmar que a produtividade agrícola aumentará se a redução no rendimento causada pelo estresse abiótico for minimizada (MICKELBART, HASEGAWA; SERRES, 2015). Iniciativas que visem ao melhoramento genético para tolerância a estresses abióticos viabilizam o cultivo de espécies em áreas originalmente consideradas inapropriadas. (SANTOS, 2017).

2.4 Uso de genes de tolerância à salinidade

O estresse salino tem sido estudado em diferentes espécies vegetais (ZHOU *et al.*, 2015) e (LI *et al.*, 2014). Atualmente, sabe-se que fatores de transcrição têm importantes papéis na regulação de diversos genes. Nesse sentido, Udawat *et al.* (2016) afirmaram que estresses abióticos possuem características multigênicas por natureza e as respostas celulares são frequentemente interligadas. Ressaltam, ainda, que respostas celulares e moleculares ao

estresse incluem acúmulo de proteínas, regulação de genes responsivos ao estresse por antioxidantes, fatores de transcrição, solutos compatíveis, abertura e fechamento de canais iônicos, fitohormônios, entre outros.

A proteína universal do estresse (USP) tem um papel vital na tolerância ao estresse abiótico em várias espécies vegetais (UDAWAT *et al.*, 2016). Estudos realizados em tabaco pelos mesmos autores corroboram que a superexpressão do gene SbUSP aumenta o crescimento da planta, alivia o acúmulo de ROS, mantém a homeostase de íons e melhora o estado fisiológico da planta sob estresses osmóticos. Os fatores de transcrição NAC têm papéis cruciais na regulação de respostas ao estresse em diversas espécies de plantas. No estudo de Hong *et al.* (2016), plantas de arroz transgênicas com superexpressão do gene ONAC022 cultivadas em substrato mostraram uma maior tolerância à seca, levando às taxas de sobrevivência mais altas e maior crescimento em relação às plantas selvagens. Quando cultivadas hidroponicamente em soluções Hoagland suplementadas com 150mM de NaCl, as plantas transgênicas também mostraram uma maior tolerância ao sal, acumulando menos Na⁺ nas raízes e brotos quando comparadas às plantas selvagens.

Zhou *et al.* (2015) constataram que fatores de transcrição WRKY estão envolvidos na resposta da planta ao estresse de alta salinidade. Desse modo, em seu estudo com algodão (*Gossypium hirsutum*), comprovaram que a superexpressão do GhWRKY34 em *Arabidopsis* aumenta a tolerância ao sal das plantas transformadas. Vários parâmetros como germinação de semente, comprimento da raiz e conteúdo de clorofila nas linhas transgênicas GhWRKY34 foram significativamente mais altos, apresentando uma taxa baixa de Na⁺/K⁺ nas folhas e raízes. Tendo estas questões em vista, os autores afirmam o GhWRKY34 como regulador positivo de transcrição que pode ajudar na manutenção da homeostase de Na⁺/K⁺, promovendo respostas positivas perante o estresse salino.

Estudos recentes como os de Khan *et al.* (2010) e Khan *et al.* (2015) apontam que a importância do ácido salicílico (SA) tem sido cada vez mais reconhecida na melhoria da tolerância ao estresse abiótico das plantas via controle mediado por SA dos principais processos metabólicos de plantas. Os autores afirmam que o SA está envolvido na indução da tolerância à salinidade aumentando a biomassa de *Torreya grandis* (espécie de conífera), isso devido aos altos índices de teor de clorofila e atividades de enzimas antioxidantes que eventualmente ativam o processo fotossintético aliviando o estresse oxidativo (LI *et al.*, 2014). A indução de AS reduziu algumas lesões causadas pelo estresse salino em *Solanum lycopersicum* (tomate) causando alterações na expressão padrão de membros da família do gene GST, como SIGSTT2, SIGSTT3, SIGSTF4 (CSISZÁR *et al.*, 2014). Estudos com SA de

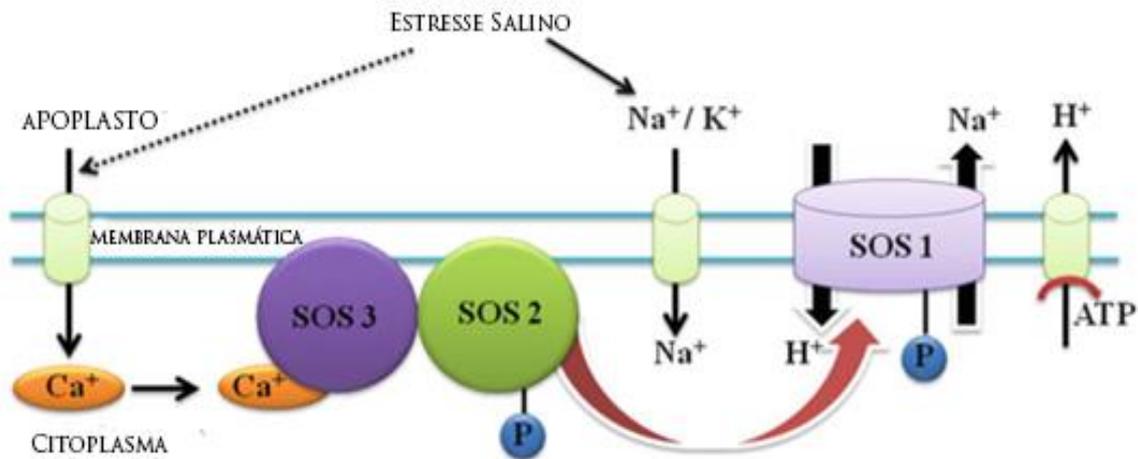
origem exógena (0,5 mM) apresentaram resultados satisfatórios em relação à tolerância ao sal em *Triticum aestivum* (trigo), devido ao aumento do nível de transcrição de genes antioxidantes: GPX1, GPX2, DHAR, GR, GST1, GST2, MDHAR e GS, e um aumento da atividade das enzimas GSH da via do ascorbato (AsA) (LI *et al.*, 2014).

A glicina betaína é um dos solutos que se acumulam nos cloroplastos de certas plantas halotolerantes quando estas são expostas a estresse salino (HAYASHI *et al.* 1997). Em resultados do estudo realizado por Hayashi *et al.* (1997), o qual teve como objetivo transformar *Arabidopsis thaliana* com o gene CodA que codifica a colina oxidase, a enzima que converte a colina em glicina betaína, foi possível observar que a planta acumulou a glicina betaína, e isso resultou em um aumento na tolerância ao estresse salino e ao frio (SANTOS, 2017).

Sharma *et al.* (2016) afirmam que, em altos níveis de sal, o mecanismo de exclusão de sódio sozinho não é capaz de manter baixos níveis de Na^+ intracelular e, portanto, os íons começam a se acumular nos tecidos vegetais. Em ambientes com alta salinidade, um aumento do nível de sódio intracelular também induz a sinalização de Ca^{2+} levando à ativação do efluxo ativo de Na^+ das células vegetais via SOS1 / SOS2 / SOS3 (Figura 2), além do transporte a longa distância de Na^+ da raiz ao topo.

Os mesmos autores explicam o resultado positivo da seguinte maneira: o Na^+ extracelular pode ser percebido por um receptor de membrana, enquanto o Na^+ intracelular pode ser percebido por proteínas de membrana ou por qualquer uma das várias enzimas sensíveis à Na^+ que se encontram no citoplasma. Apesar da identidade molecular dos “sensores” de sódio ainda permanecerem desconhecidos, o antiportador de Na^+/H^+ ‘Salt Overly Sensitive 1’ (SOS1) é um possível candidato. O antiportador gera um mecanismo baseado em perceber o estresse salino e essa percepção envolve um aumento do Ca^+ citosólico, interações proteicas e fosforilação reversível com SOS1, agindo em conjunto com duas outras proteínas chamadas SOS2 e SOS3. Além disso, proteínas SOS4 e SOS5 também foram caracterizadas e ajudam na manutenção da integridade e arquitetura da parede celular sob estresse salino (MAHAJAN; PANDEY; TUTEJA, 2008).

Figura 2 - Modelo das vias SOS em resposta ao estresse salino



Fonte: adaptado de Gupta; Huang (2014)

2.5 Prospecção e Validação de Promotores / Genes Responsivos a Estresse Salino

Com o sequenciamento do genoma humano surgiu a “era pós genômica”. Neste contexto, outras técnicas foram avançando, como a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, objetivando o isolamento e caracterização do RNA, das proteínas e dos metabólitos, respectivamente. As ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas concomitantemente. O termo “ômica” refere-se à análise global dos sistemas biológicos (VARGAS, 2014).

A bioinformática é a utilização de métodos computacionais, matemáticos e estatísticos para analisar dados biológicos, bioquímicos e biofísicos. Pode ser definida como uma ciência e tecnologia de aprendizagem, gestão e processamento de informação biológica. A bioinformática é muitas vezes focada na obtenção e orientação de dados biológicos, na organização destas informações em bases de dados, no desenvolvimento de métodos para obtenção de informações úteis e, a partir de tais bases de dados, na elaboração de métodos para a integração de informações relacionadas a partir de diferentes fontes (PIMENTEL *et al.*, 2016).

Partindo do melhoramento genético clássico, os fenótipos desejáveis eram estudados na tentativa de se descobrir os genes responsáveis pelas características de interesse. Este processo de genética direta é possível graças ao desenvolvimento de técnicas que possibilitam o sequenciamento do genoma, ou parte dele. A alta precisão e redução dos custos facilitou e alavancou os estudos de genômica por todo o mundo (SANTOS, 2017). Com os avanços de outras técnicas e a facilidade de acesso às informações disponíveis em banco de dados, é

possível que se faça o contrário: a escolha de um gene de interesse, sua inserção na planta e posterior análise fenotípica, a chamada genética reversa (CARNEIRO *et al.*, 2000).

Desse modo, a genética reversa é uma estratégia para determinar a função de um gene em particular, estudando os fenótipos de indivíduos com alterações no gene de interesse (SESSIONS *et al.*, 2002). Os mesmos autores completam que sequências homólogas podem ser úteis para prever a função e caracterização do gene, porém, existem muitos genes sem homologia com genes com características funcionais. Além disso, apesar da homologia de sequência poder revelar as funções gerais, a função precisa de um gene específico que não pode necessariamente ser determinado apenas com homologia de sequência isolada. A resposta de tolerância à seca e outros estresses abióticos é carregada por vários genes, fatores de transcrição, hormônios, proteínas, cofatores, íons e metabólitos (BUDAK *et al.*, 2015). Em anos recentes, vários marcadores moleculares, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e loci de característica quantitativa (QTL), associados com genes para sinalização de seca e outros estresses, foram referidos. Estratégias genômicas que podem identificar e transferir genes específicos com facilidade, explorar parentes selvagens de plantações, agora requerem menos tempo e trabalho para desenvolver cultivares de grande valor (BUDAK, 2015).

A descoberta de marcadores de DNA para características relacionadas a estresses tem ajudado a selecionar os traços e parentescos com facilidade e confiabilidade em um tempo consideravelmente menor. Portanto, marcadores, especialmente os SNPs, apresentam alta capacidade na identificação de genes ligados à seca e outros estresses (BUDAK, 2015). Além de toda essa gama de utilizações apresentadas, o uso de genética reversa para a validação de genes candidatos à tolerância a estresses abióticos e bióticos necessita de plantas modelo que, além das características inerentes a este tipo de planta, apresentem também intolerância aos estresses alvo. (SANTOS, 2017).

A identificação e caracterização de genes de resposta e/ou resistência ao estresse salino em plantas têm sido alvo de diversas pesquisas em todo o mundo. Nos últimos anos, têm se destacado as análises comparativas de genomas; o uso de bibliotecas de subtração e a análise da expressão de conjuntos gênicos, em larga escala (FERREIRA, 2008).

A identificação correta de genes diferencialmente expressos entre condições específicas é essencial na compreensão de variações fenotípicas (COSTA-SILVA; DOMINGUES; LOPES, 2017). O RNA-Seq é a abordagem mais abrangente e baseada em sequenciamento de alto rendimento para a análise qualitativa e quantitativa de transcritomas inteiros de organismos modelo e não modelo. O cDNA fragmentado é sequenciado, as

sequências resultantes ("leituras") são mapeadas e comparadas com genomas ou transcritomas conhecidos. Para organismos não modelo, as leituras são montadas e anotadas, por exemplo, em bancos de dados de proteínas ou outros transcritomas. A quantificação dos RNAs ou contigs é alcançada contando os fragmentos correspondentes após anotação em um genoma ou transcritoma conhecido ou após montagem de novo e anotação no banco de dados de proteínas Swissprot / TREMBL. Como as transcrições completas podem ser analisadas, a técnica detecta variantes de emenda, SNPs e indels, locais de início da transcrição e poliadenilação alternativa (GENXPRO, 2019).

O trabalho de Torres (2017) teve como o objetivo obter uma visão global dos transcritos ativos em *C. arabica* usando a técnica de RNA-Seq e analisar genes específicos altamente expressos em folhas com potencial de características exploratórias para melhoramento e compreensão da biologia evolutiva do café. A identificação e caracterização desses genes possibilitam a realização de novos estudos, como a análise da expressão diferencial entre plantas cultivadas em campo e em casa de vegetação, ou a prospecção da variabilidade natural utilizando diferentes materiais genéticos, que possibilitam a identificação e validação de polimorfismos e de alelos específicos para o desenvolvimento de marcadores moleculares associados à tolerância a vários estresses abióticos, inclusive ao estresse salino.

O estudo de Reichel (2016) objetivou analisar a expressão dos genes da subfamília DREB em resposta à seca em plantas de *Coffea canephora* Conilon. Os conhecimentos podem fornecer subsídios para a compreensão do determinismo genético da tolerância à seca em *C. canephora*, cujo objetivo final é aumentar a sua produção, qualidade e sustentabilidade através de programas de melhoramento genético em cafeeiro.

A PCR em tempo real foi descrita pela primeira vez no início da década de 1990 por Higuchi e seus colaboradores, que desenvolveram um sistema ao qual uma câmera de vídeo foi acoplada, de modo a monitorar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permitiu-lhes observar o aumento da fluorescência, durante a reação, em virtude da ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla fita recém-sintetizadas (HIGUCHI *et al.*, 1993).

O monitoramento da PCR, em tempo real, revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A então denominada PCR em tempo real permite a quantificação desses ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, uma vez que determina valores de quantificação durante a fase exponencial da reação. O acúmulo de produtos da PCR é detectado e monitorado diretamente pela leitura do aumento da

fluorescência do fluóforo utilizado, enquanto na PCR tradicional os produtos precisam ser posteriormente analisados por eletroforese (VARGAS, 2014).

O principal fundamento na utilização desse método é o chamado limiar do ciclo, ou *threshold cycle* (Ct). O Ct é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada limiar. Para apresentar os dados na forma de Ct, deve-se certificar que o limiar está delimitado na fase exponencial de amplificação, acima do ruído de fundo e abaixo da fase de platô da reação de PCR. O valor numérico do Ct é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito de interesse na reação, ou seja, quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade inicial do transcrito na amostra (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

A PCR em tempo real possui componentes essenciais para seu funcionamento, entre eles um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação, (AMBION, 2019). Duas maneiras distintas são aplicáveis, para que se possa realizar a análise de resultados obtidos em experimentos utilizando a PCR em tempo real, a quantificação absoluta e a relativa. A quantificação absoluta representa a quantidade de cópias do transcrito de interesse, enquanto a quantificação relativa demonstra alteração na expressão do gene alvo relativa a algum grupo referência como um controle não tratado ou uma amostra tempo zero. A quantificação absoluta é utilizada quando se precisa conhecer a quantidade de *amplicons*, por exemplo, na quantificação em cálculos de carga viral (SUGDEN; WINTER, 2008). Tendo a técnica apresentada em vista, a mesma é uma alternativa para validação de promotores de genes responsivos a diferentes estresses, tanto biótico como abiótico.

2.6 Caracterização das respostas morfofisiológicas de *Setaria viridis* L. (Acesso A10.1) ao estresse de salinidade mediante emprego da fenômica

Muitas plantas são importantes para fins científicos no que tange à facilidade de domesticação, manipulação e transformação genética (SANTOS, 2017). Parida (2005); Munns e Tester (2008), entre outros, destacam a existência de duas plantas modelo muito conhecidas e utilizadas na comunidade científica, visando principalmente a questões relacionadas ao estresse abiótico, a *Arabidopsis thaliana*, planta herbácea comum na Europa e na Ásia, e a espécie de arroz *Oryza sativa*. Outra planta modelo tradicionalmente usada é o tabaco (WANG *et al.*, 2019). Porém, todas essas plantas-modelo representam o mecanismo fotossintético C3. A *Setaria viridis* é uma importante planta modelo que está emergindo

rapidamente como um sistema de escolha para o estudo do desenvolvimento de plantas do mecanismo fotossintético C4 (SANTOS, 2017).

A planta modelo utilizada no presente estudo é a *S. viridis*, pertencente à ordem Cyperales, ao gênero *Setaria* e à família poaceae (Gramíneas). É uma planta diplóide ($2n = 2x = 18$), conhecida popularmente como rabo de raposa verde, além disso, seu genoma é relativamente pequeno, chegando a aproximadamente 510Mb (BRUTNELL *et al.*, 2010). Essa espécie tem sido estudada visando à sua utilização como planta modelo para estudos de genética reversa, objetivando a validação de genes e promotores especialmente no que se refere aos estudos de fotossíntese de plantas C4.

A *S. italica* e seu ancestral selvagem, *Setaria viridis*, reúnem características de interesse como baixa estatura, entre 15 a 40 cm, o que facilita a manipulação e acondicionamento. O ciclo de vida é curto, entre 6 e 9 semanas, dependendo das condições de fotoperíodo, possuindo elevada produção de sementes, aproximadamente 13.000 por planta, motivo pelo qual pode estar atribuído à característica das mesmas de autopolinizarem-se (BRUTNELL *et al.*, 2010). Estes autores ainda salientam que tais espécies podem ser transformadas através do método *Agrobacterium*.

Além das características biológicas favoráveis apresentadas pela *S. viridis*, segundo Martins *et al.* (2015), o protocolo de transformação genética pelo método *Agrobacterium* contribui significativamente para a adoção dessa espécie como planta modelo, adicionando seu emprego na pesquisa aplicada, incluindo a tolerância de diferentes estresses abióticos e o melhoramento relacionado à quantidade de biomassa para a produção de etanol de segunda geração (2G). Santos (2017) afirma que descobertas em modelos genéticos adiantados, tais como a ervilha (*Pisum sativum*) e o milho (*Zea mays*), foram vitais para os conhecimentos das bases genéticas modernas conhecidas atualmente.

A *S. viridis* tem sido proposta como planta modelo para validação de genes, devido aos vários aspectos biológicos favoráveis previamente citados. As ferramentas de fenotipagem podem ser aliadas aos estudos de engenharia genética e em estudos relacionados ao grau de intolerância desse acesso a diversos estresses, o que pode permitir o uso da mesma para validação de genes de tolerância (SANTOS, 2017). Os métodos atuais de fenotipagem visam à descrição quantitativa da anatomia, ontogênese e propriedades fisiológicas e bioquímicas das plantas. Buscam avaliações rápidas, em larga escala, com métodos não destrutivos realizados muitas vezes no campo, baseados em imagens geradas por técnicas espectroscópicas em diferentes regiões do espectro eletromagnético (WALTER; LIEBISCH; HUND, 2015).

Santos (2017) ressalta que, dentre as ferramentas utilizadas pela fenômica, estão as câmeras digitais para captura e análise de imagens, a exemplo da área foliar; as câmeras de infravermelho, que podem mostrar gradientes de temperatura e que estão diretamente relacionados com a dissipação de energia; o uso de imagens geradas por detectores de fluorescência e índices de concentração de clorofila. O IRGA, Infrared Gas Analyzer, foi um dos equipamentos precursores, sendo que com o mesmo é possível medir parâmetros como taxa de assimilação líquida de carbono, taxa de fotossíntese e taxa transpiratória (BORÉM; FRISCHE-NETO, 2013).

Existem poucos trabalhos que citam a *S. viridis* (Acesso A10,1) como potencial planta modelo para prospecção de genes responsivos a estresses. O trabalho de Santos (2017) utiliza a setária desse acesso submentendo a mesma em dois estresses abióticos, ao de frio e ao de salinidade, e em diferentes estádios de desenvolvimento, tudo isso buscando validar a *S. viridis* como possível planta modelo para os respectivos estresses. Os resultados apresentados indicam certa sensibilidade da *S. viridis* para os dois estresses avaliados, entretanto, estes necessitam ser melhor caracterizados.

O trabalho de Muthamilarasan *et al.* (2015) mostrou que a expressão de TFs WRKY em *S. viridis* e em *S. italica* em resposta a estresses abióticos de amplo espectro sugere sua participação na regulação de mecanismos de sinalização durante o estresse ambiental. Plantas C4 vem ganhando ímpeto em investigação de biologia do estresse devido à sua maior eficiência na utilização de água (SADRAS; GRASSINI; STEDUTO, 2011). A *Setaria italica* e sua ancestral selvagem *S. viridis* vem sendo identificadas como planta modelo para o estudo de fotossíntese C4 e para tolerância a estresses abióticos (MUTHAMILARASAN *et al.*, 2015). Além disso, ambas as espécies compartilham sinergia genética com várias gramíneas utilizadas para a produção de biocombustíveis; e, portanto, *S. italica* e *S. viridis* também foram consideradas como sistemas modelo para pesquisa em bioenergia e estudos de nutrição (LI; BRUTNELL, 2011). Porém, nenhum dos estudos citados acima utiliza a *S. viridis* do acesso A10.1 como planta modelo em estudos em validação de genes e/ou promotores responsivos ao estresse salino.

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Hipóteses

Este projeto estudo visa testar duas hipóteses, que são:

- 1) A *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) é intolerante a estresse salino, e consequentemente pode ser utilizada como planta modelo para validação de genes candidatos a conferir tolerância à salinidade; e
- 2) O perfil de expressão de genes de *Elaeis guineensis* Jacq. responsivos a estresse de salinidade, observado mediante análise *in silico* de expressão diferencial, é igual ao observado *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

Para testar as duas hipóteses acima apresentadas, buscaremos alcançar os seguintes objetivos específicos, sendo que os dois primeiros dizem respeito à primeira hipótese, e os três últimos, à segunda:

- Avaliar a germinação e o desenvolvimento inicial de *Setaria viridis* (A10.1) quando submetida a estresse salino;
- Avaliar a resposta morfofisiológica da *S. viridis* (A10.1) ao estresse salino, aplicado no estágio 2 (fase vegetativa);
- Prospectar no genoma de palma de óleo (*Elaeis guineensis*) genes responsivos ao estresse salino;
- Realizar a anotação estrutural e funcional dos genes prospectados; e
- Caracterizar, mediante emprego da técnica de qPCR, o perfil de expressão dos genes responsivos a estresse salino selecionados.

4 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

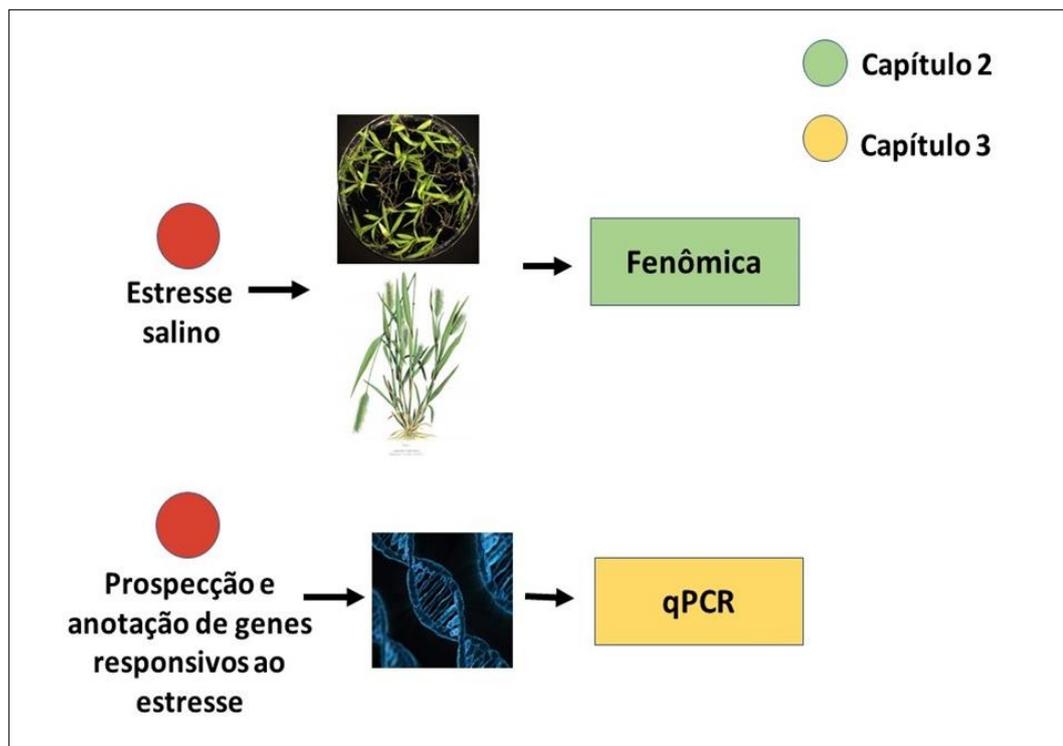
Para facilitar a compreensão, o trabalho foi dividido em três capítulos, evidenciados a seguir e na figura 3.

Capítulo 1 – Introdução Geral.

Capítulo 2 – Respostas morfofisiológicas de *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) a diferentes concentrações de NaCl durante a germinação de sementes, no desenvolvimento inicial das plântulas, e na fase vegetativa de crescimento das plantas.

Capítulo 3 - Prospecção e anotação de genes responsivos a estresse de salinidade em dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), e caracterização do perfil de expressão gênica mediante emprego de qPCR.

Figura 3 - Estruturação da dissertação (capítulos)



Legenda: A dissertação foi dividida em quatro capítulos: Capítulo 2 – Caracterização da resposta morfofisiológica de *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) a diferentes concentrações de NaCl na germinação das sementes e desenvolvimento inicial, e na fase vegetativa. Capítulo 3 - Prospecção e anotação de genes responsivos a estresse de salinidade em dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), e caracterização do perfil de expressão gênica mediante emprego de qPCR.

Fonte: Da autora (2020).

REFERÊNCIAS

- AMBION. Real-Time PCR (qPCR) guide. [2019]. Disponível em: <http://www.ambion.com/techlib/tn/81/813.html>. Acesso em: 20 nov. 2019
- BORÉM, A.; FRISCHE-NETO, R. Ômicas: Abrindo a caixa preta do fenótipo. *In*: BORÉM, A.; FRISCHE-NETO, R. **Ômicas 360º: Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. p. 9-22.
- BUDAK, H. *et al.* From Genetics to Functional Genomics: Improvement in Drought Signaling and Tolerance in Wheat. *Front. Plant Science*, v. 6, n. 1012, nov. 2015. DOI 10.3389/fpls.2015.01012.
- BRUTNELL, T. P. *et al.* *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. *The Plant cell*, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, 2010.
- CARDILLO, A. B.; GIULIETTI, A. M.; MARCONI, P. L. Analysis and sequencing of h6hmRNA, last enzyme in the tropane alkaloids pathway from anthers and hairy root cultures of *Brugmansia candida* (Solanaceae). *Electronic Journal of Biotechnology*, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 196-198, 2006.
- CARNEIRO, P. T. *et al.* Evapotranspiração do cajueiro anão precoce sob estresse salino em diferentes fases fenológicas. *Irriga - Winotec*, v. 1, n. 1, ed. esp., p. 351-367, 2012. DOI: <https://doi.org/10.15809/irriga.2012v1n01p351>
- COSTA-SILVA, J.; DOMINGUES, D.; LOPES, F. M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS ONE*, v. 12, n. 12, e0190152, p. 1-18, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>
- CSISZÁR, J. *et al.* Glutathione transferase supergene family in tomato: salt stress regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 78, p. 15-26, 2014. DOI 10.1016/j.plaphy.2014.02.010.
- DEINLEIN, U. *et al.* Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in plant science*, v. 19, n. 6, p. 371-379, 2014.
- DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Efeitos dos sais na planta e tolerância das culturas à salinidade. *In*: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT Sal, p. 39, 149-158, 2010.
- EMBRAPA. Soja em números. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 04 jun. 2018.
- FAO. Salt-affected soils. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/soils-portal/soilmanagement/management-of-some-problem-soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en/>. Acesso em: 20 jul. 2019.
- FAO. The State of Food and Agriculture. Social Protection and Agriculture: Breaking the cycle of rural poverty. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**, Rome, 2015.

FERREIRA, B. S. **Expressão diferencial de genes envolvidos na resposta ao estresse salino em cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) e arroz (*Oryza sativa*)**. 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2008.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual review of plant physiology**, v. 31, n. 1, p. 149-190, 1980.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **Hindawi Publishing Corporation International Journal of Genomics**, Article ID 701596, p. 1-18, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/701596>.

HAYASHI, H. *et al.* Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the cod A gene for choline oxidase: accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 12, n. 1, p. 133-42, jul. 1997.

HIGUCHI, R. *et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature**, London, v. 11, n. 11, p. 1026-1030, nov. 1993.

HONG, Y. *et al.* Overexpression of a Stress-Responsive NAC Transcription Factor Gene ONAC022 Improves Drought and Salt Tolerance in Rice. **Front. Plant Sci.**, v. 7, n. 4, 2016. DOI 10.3389/fpls.2016.00004.

HU, H. *et al.* Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 12987-12992, 2006.

JAMES, R. A. *et al.* Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2939–2947, 2011.

KHAN, N. *et al.* Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. **Intl. J. Plant. Biol.**, v. 1, n. e1, 2010. DOI 10.4081/pb.2010.e1.

LI, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Exp. Bot.**, v. 62, n. 9, p. 3031–3037, 2011. DOI 10.1093/jxb/err096.

LI, T. *et al.* Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in *Torreyagrandscv. merrillii* seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, e109492, p. 1-9, 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0109492.

MAHAJAN, S.; PANDEY, G. K.; TUTEJA, N. Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. **Arch Biochem Biophys**, v. 471, n. 2, p. 146–158, 2008.

MARTINS, P. K. *et al.* A simple and highly efficient Agrobacterium-mediated transformation protocol for *Setaria viridis*. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 41-44, 2015.

MICKELBART, M. V.; HASEGAWA, P. M.; SERRES, J. B. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Reviews Genetics**. AOP, v. 16, n. 4, p. 237-251, March 2015. DOI 10.1038/nrg3901.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 645-663, 2005.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Ann. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681, 2008. DOI 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.

MUTHAMILARASAN, M. *et al.* Global analysis of WRKY transcription factor superfamily in *Setaria* identifies potential candidates involved in abiotic stress signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 910, 2015.

NASA. Disponível em: <https://www.nasa.gov>. Acesso em: 11 jul. 2018.

PARIDA, A.K.; DASA, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005. DOI 10.1016/j.ecoenv.2004.06.010.

PARIHAR, P. *et al.* Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environ Sci Pollut Res.**, v. 22, n. 6, p. 4056-4075, 2015. DOI 10.1007/s11356-014-3739-1.

PEDROTTI, A. *et al.* Causas e consequências do processo de salinização dos solos Causes and consequences of the process of soil salinization. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental Santa Maria**, v. 19, n. 2, p. 1308-1324, maio/ago. 2015. DOI 105902/2236117016544.

PITMAN, M. G.; LÄUCHLI, A. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. *In*: LÄUCHLI, A.; LÜTTGE, U. (ed.). **Salinity: environment-plants-molecules**. Dordrecht: Springer, 2002. p. 3-20.

QADIR, M. *et al.* Economics of salt-induced land degradation and restoration. **Natural Resources Forum**, Wiley Online Library, v. 38, n. 4, p. 282-295, 2014.

RAHMAN, H. *et al.* Phenomics: technologies and applications in plant and agriculture. *In*: BARH, D.; KHAN, M. S.; DAVIES, E. (ed.). **PlantOmics: The Omics of Plant Science**. New Delhi, India: Springer India, 2015. p. 385-411.

R. CORE TEAM: A language and environment for statistical computing. **Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2013. 2017.

REICHEL, T., **Análise da expressão dos genes da subfamília dreb em resposta à seca em plantas de *Coffea canephora* Conilon**. 2016. 88 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

RHOADES, J. D.; KANDIAH, A.; MASHALI, A. M. **Uso de águas salinas para produção agrícola**. Campina Grande: UFPB, 2000.

RIBEIRO, M. R. *et al.* Química dos solos salinos e sódicos. *In*: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (ed.). **Química e mineralogia do solo**. Parte II - Aplicações. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p. 449-484.

- RIBEIRO, M. R.; FREIRE, F. J.; MONTENEGRO, A. A. A. Solos halomórficos no Brasil: Ocorrência, gênese, classificação, uso e manejo sustentável. *In*: CURI, N.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M.; LOPES, A. S.; ALVAREZ, V. H. (ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. p. 165-208.
- RICHARDS, L. A. (ed.) **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington D.C.: U.S. Salinity Laboratory., 1954. 160p. (USDA. Agriculture Handbook, 60).
- SADRAS, V.; GRASSINI, P.; STEDUTO, P. **The State of World's Land and Water Resources for Food and Agriculture (SOLAW)**. London: FAO, 2011.
- SANTOS, M. L. **Prospecção e caracterização de genes análogos de resistência (RGAS) em *Elais* spp. e avaliação da tolerância de *Setaria viridis* a estresse salino e de frio**. 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2017.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, June 2008.
- SCHOSSLER, T. R. *et al.* Salinidade: Efeitos na fisiologia e na nutrição mineral de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 1563-1578, 2012.
- SERTÃO, M. A. J. **Uso de corretivos e cultivo do capim *Urocloa* (*Uroclamo sambicensis* (Hack) Daudy) em solos degradados do Semi-árido**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, 2005.
- SESSIONS, A. *et al.* A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. **The Plant Cell**, v. 14, p. 2985–2994, 2002.
- SHABALA, S.; POTTOSIN, I. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. **Physiol. Plant.**, v. 151, n. 3, p. 257-279, 2014. DOI 10.1111/ppl.12165.
- SHARMA, P.C. *et al.* Physiological and Molecular Insights into Mechanisms for Salt Tolerance in Plants. *In*: DAGAR, J. C. (ed.). **Innovative Saline Agriculture**. New Delhi, India: Springer, 2016. DOI 10.1007/978-81-322-2770-0_15321.
- SILVA, F. A. M. *et al.* Efeito do estresse salino sobre a nutrição mineral e o crescimento de mudas de Aroeira (*Myracrodruo nurundeuva*) cultivadas em solução nutritiva. **Cerne**, v. 6, n. 1, p. 52-59, 2000.
- SUGDEN, D.; WINTER, P. **Molecular biomethods handbook**. Berlin: Springer, 2008.
- TORRES, L. F., **RNA-Seq em *Coffea arabica*: Genes candidatos em condições de estresse abiótico**. 2017. 192 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- UDAWAT, P. *et al.* Overexpression of a Cytosolic Abiotic Stress Responsive Universal Stress Protein (SbUSP) Mitigates Salt and Osmotic Stress in Transgenic Tobacco Plants. **Front. Plant Sci.**, v. 7, n. 518, p. 1-21, 2016. DOI 10.3389/fpls.2016.00518.

VARGAS, L. H. G. **Prospecção de Gens de Tecido Específico e Metabólitos em *Elaeis spp.*** 2014. 139 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

WALTER, A.; LIEBISCH, F.; HUND, A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. **Plant Methods**, v. 11; n. 14, p. 1-11, 2015. DOI 10.1186/s13007-015-0056-8.

WHEELER, T.; VON BRAUN, J. Climate Change Impacts on Global Food Security. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 508-513, 2013. DOI: 10.1126/science.1239402.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. *In*: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U. M. T. (ed.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: MXM Gráfica e Editora, 2005. Parte II, cap. 10, p. 118-126.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Origen y naturaleza de los ambientes salinos. *In*: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. (ed.). **La Ecofisiología Vegetal: Una ciencia de síntesis**. Madrid: Thomson, 2004. cap. 10, p. 303-330.

ZHOU, L. *et al.* Overexpression of a cotton (*Gossypium hirsutum*) WRKY gene, GhWRKY34, in *Arabidopsis* enhances salt-tolerance of the transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 311-320, 2015. DOI 10.1016/j.plaphy.2015.08.016

CAPÍTULO 2

Respostas morfofisiológicas de *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) a diferentes concentrações de NaCl durante a germinação de sementes, no desenvolvimento inicial das plântulas, e na fase vegetativa de crescimento das plantas

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar as respostas de *Setaria viridis* acesso A10.1 à salinidade, visando o seu potencial uso como planta modelo para validar genes de tolerância ao sal. No primeiro experimento, sementes de *S. viridis* foram submetidas à germinação em meio de cultura contendo 0, 30, 60, 90, 120 ou 150 mM de NaCl. As plântulas resultantes foram mantidas no meio usado para germinação durante a fase inicial do crescimento. No segundo experimento, plantas no estágio de crescimento vegetativo foram submetidas a doses crescentes de NaCl no substrato de cultivo, que corresponderam aos valores de condutividade elétrica de 3, 9, 14, 20, 25 e 31 dSm⁻¹. A percentagem de germinação de sementes de *Setaria* foi pouco afetada pela salinidade no substrato, enquanto o desenvolvimento inicial das plântulas foi altamente prejudicado. As plântulas submetidas a 150 mM de NaCl apresentaram, em média, 8% da área foliar do controle. O sistema radicular das plantas, também, foi duramente afetado pela salinidade. A 150 mM de NaCl, o comprimento por volume, o comprimento total e o volume das raízes apresentaram redução igual ou superior a 90%. Nas plantas submetidas à salinidade no estágio de crescimento vegetativo, houve redução nas taxas de evapotranspiração e nos teores de pigmentos, comprometimento do sistema de captura e utilização da luz e queda nas taxas de trocas gasosas foliares. Estas respostas foram proporcionais à dose de sal e se refletiram em menor acúmulo de biomassa seca e fresca na parte aérea. A partir de 25 dSm⁻¹, todas as plantas morreram.

Palavras-chave: Estresse Abiótico. Salinidade. Fenômica. Planta modelo.

Morphophysiological responses of *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (accession A10.1) to different NaCl concentrations during seed germination, the initial development of the seedling, and in the vegetative development phase

ABSTRACT

This work aimed to study the responses of *Setaria viridis* accession A10.1 to salinity, aiming at its potential use as a model plant to validate salt tolerance genes. In the first experiment, seeds of *S. viridis* were sown on culture medium supplemented with NaCl at different concentrations (0, 30, 60, 90, 120 or 150 mM). After germination, the resulting seedlings were kept for two additional days on the germination medium - the initial growth phase. In the second experiment, plants in the vegetative growth stage were subjected to increasing doses of NaCl in the cultivation substrate, which corresponded to the electrical conductivity values of 3, 9, 14, 20, 25 and 31 dSm^{-1} . The percentage of germination was little affected by the salinity in the substrate, while the initial seedling development was highly impaired. Seedlings submitted to 150 mM NaCl presented, on average, only 8% of the leaf area of the control. The seedlings' root system was also severely affected by salinity. At 150 mM NaCl, the length per volume, the total length and the volume of the roots showed a reduction equal to or greater than 90%. In plants submitted to salinity in the vegetative growth stage, there was a reduction in evapotranspiration rates and pigment levels, impairment of the capture system and use of light and a decrease in leaf gas exchange rates. These responses were proportional to the salt dose and were reflected in less accumulation of dry and fresh biomass in the aerial part. All plants died when electric conductivity was higher than 25 dSm^{-1} .

Keywords: Abiotic Stress. Salinity. Phenomics. Model Plant

1 INTRODUÇÃO

A salinidade dos solos é um problema recorrente em diversas partes do mundo, com predominância em regiões áridas e semiáridas (FAO, 2015). Mais de 100 países são afetados pela presença de sal em seus solos e a tendência mundial é que mais áreas sejam afetadas devido aos atuais cenários das alterações climáticas (ZAMAN; SHAHID; HENG, 2018). Segundo a FAO (2019), estima-se que dos 1.5 bilhões de hectares utilizados na agricultura de sequeiro, e dos 230 milhões de hectares utilizados na agricultura irrigada, 2.1% e 19.5% encontram-se afetados pela salinidade, respectivamente. No Brasil, os solos salinos e sódicos ocorrem na região do Pantanal mato-grossense e, principalmente, na região semiárida do Nordeste (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os sais exercem efeitos de forma direta ou indireta, lenta ou abrupta, total ou parcial sobre o desenvolvimento e produção das plantas (SERTÃO, 2005). Tais efeitos estão relacionados às respostas das plantas, tanto na fisiologia quanto no metabolismo, sendo observado em todos os níveis de desenvolvimento, provocando redução ou perda de produtividade (RIBEIRO *et al.*, 2009). O estresse salino afeta todos os principais processos do vegetal, tais como germinação, crescimento, níveis de pigmentos fotossintéticos, taxa de fotossíntese, absorção de água, homeostase de nutrientes, e, por consequência, o rendimento (PARIHAR *et al.*, 2015).

A inibição do crescimento e da produção vegetal se deve à redução no potencial osmótico da solução do solo, provocado pelo excesso de sais e/ou ao efeito tóxico dos mesmos (SILVA *et al.*, 2000). Na fase inicial do estresse salino, conhecida fase osmótica, a absorção de água pela raiz diminui (MUNNS, 2005). O estresse osmótico causa mudanças fisiológicas como desequilíbrios de nutrientes, diminuição da capacidade de desintoxicar espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuição na atividade fotossintética e na abertura estomática (MUNNS; TESTER, 2008). Em uma fase posterior, o estresse salino desencadeia o estresse iônico, e tal efeito é um dos mais prejudiciais, pois gera um acúmulo de íons Na^+ e Cl^- nos tecidos de plantas cultivadas em solos com altas concentrações de NaCl (JAMES *et al.*, 2011).

Pela sua importância, a salinidade tem sido foco de estudos que visam, a longo prazo, a prospecção, validação e ao uso de genes de tolerância a esse estresse abiótico (UDAWAT *et al.*, 2016). A validação de genes candidatos de tolerância à salinidade, tanto como de promotores de genes responsivos ao estresse salino, dá-se normalmente mediante emprego de estratégia de genética reversa utilizando-se plantas modelo.

Parihar *et al.* (2015); Munns e Tester (2008) entre outros, destacam a existência de três plantas modelos muito conhecidas e utilizadas na comunidade científica, visando principalmente estudos relacionados aos estresses abióticos: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Oryza sativa* L e *Solanum lycopersicum*. Especificamente visando o estudo do estresse salino utilizando a abordagem genômica, na maioria dos estudos é o arroz, o tabaco e a *Arabidopsis* que tem sido utilizada como planta modelo (FLOWERS, 2004). Todas essas plantas têm em comum o fato de possuírem o mecanismo fotossintético C3. A *Setaria viridis* pertence à ordem Cyperales, ao gênero *Setaria* e à família poaceae (Gramíneas). É uma planta diplóide ($2n = 2x = 18$), com um genoma relativamente pequeno, chegando a aproximadamente 510 Mb. A espécie possui características de interesse como baixa estatura, ciclo de vida curto, abundante produção de sementes, existência de protocolos para cultura de tecidos e transformação genética (BRUTNELL *et al.*, 2010). A *S. viridis* está emergindo rapidamente como a planta modelo para o estudo de validação de genes para plantas C4 (BRUTNELL *et al.*, 2010; BRUTNELL; BENNETZEN; VOGEL, 2015; LI; BRUTNELL, 2011; MARTINS *et al.*, 2019).

No entanto, os estudos que avaliam as respostas dos acessos de *S. viridis* aos estresses abióticos ainda são escassos (HUANG *et al.*, 2016). Não se sabe, por exemplo, se a planta é susceptível ou tolerante à salinidade. Este trabalho teve como objetivo determinar se o acesso A10.1 de *S. viridis* é tolerante ou susceptível à salinidade, visando o seu potencial uso como planta modelo para validar genes de tolerância ao referido estresse

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Germinação das sementes e crescimento inicial das plântulas sob estresse salino

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB) da Embrapa Agroenergia, em Brasília, DF, Brasil (S—15.732°, W—47.900).

Santos (2017) realizou um trabalho prévio com o objetivo de determinar se a *Setaria viridis* (acesso A 10.1) é uma espécie sensível aos estresses de salinidade, podendo servir como planta modelo para validação de genes de tolerância a este estresse. O presente estudo complementa o estudo realizado por Santos (2017), tendo sido utilizadas as mesmas concentrações salinas e a mesma quantidade de réplicas biológicas, tanto para avaliações de germinação e desenvolvimento inicial como para o segundo estágio de desenvolvimento de *S. viridis* acesso A10.1. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo comprovar que este acesso de *S. viridis* pode ser usado como planta modelo para validação de genes de tolerância a este estresse utilizando mais equipamentos de fenotipagem para tal.

Utilizaram-se sementes de *S. viridis* acesso A10.1. As sementes foram submetidas à quebra de dormência pelo tratamento com ácido sulfúrico (1000 μM) por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas em água deionizada e submetidas à desinfecção em solução com hipoclorito de sódio (2%) e Tween 20® (0.1%). Por fim, as sementes foram secas em papel de filtro estéril.

As sementes foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura esterilizado, com diferentes concentrações de NaCl. Utilizou-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) a $1/2$ força e pH 5,8. No seu preparo, foram adicionados os seguintes suplementos, nas seguintes quantidades: 1 mL^{-1} de vitaminas, 20 gL^{-1} de sacarose, 2,0 gL^{-1} de Phytigel, e 100 mgL^{-1} de inositol. A um volume padronizado do meio MS foram acrescentadas as quantidades crescentes de NaCl, de modo a se obterem as concentrações salinas de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 mM de NaCl. O meio MS salinizado foi esterilizado por 20 minutos em autoclave a 121°C/1 atm. Após resfriamento a 25°C, mediu-se a condutividade elétrica em cada concentração salina. Por fim, distribuiu-se o meio em placas de Petri e semeou-se as sementes.

Para este estudo foram utilizadas quatro placas de Petri (90x15 cm) para cada concentração salina. Em cada placa foram semeadas 20 sementes. Após o semeio, as placas foram mantidas em uma câmara de crescimento Conviron® modelo Adaptis 1000TC (Controlled Environments Inc., Winnipeg, Canada) sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de 25±2°C e intensidade de luz de 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

A percentagem de germinação das sementes foi avaliada 7 dias após o semeio. Foram consideradas germinadas as sementes que originaram plântulas compostas de parte aérea e sistema radicular. Aos 9 dias após o semeio, foi determinada a área foliar e as variáveis relacionadas à morfologia do sistema radicular das plântulas. A área foliar das plântulas foi determinada por meio da técnica de fluorescência de clorofila por imagem, utilizando-se um fluorômetro Walz modelo IMAGING-PAM versão Maxi (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Para isso, as plântulas foram previamente mantidas no escuro por 30 minutos e, em seguida, submetidas a uma rotina que mede, inicialmente, a fluorescência inicial (F_0), com a menor intensidade luminosa possível, e a fluorescência máxima (F_m), a partir de um pulso de luz saturante ($2800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). O software Imaging Win, que controla o equipamento, permite a determinação da área que gera um sinal de fluorescência a partir da imagem de qualquer parâmetro. Para as plântulas de *S. viridis*, a área foliar foi estimada a partir da área de emissão do sinal de fluorescência máxima (F_m). O cálculo da área é independente da concentração de clorofila e da intensidade do sinal de fluorescência.

Para a determinação das variáveis relacionadas à morfologia do sistema radicular, utilizou-se o sistema de escaneamento de raízes Regent *WinRHIZO* v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), acoplado a um *scanner* profissional Epson XL 10000, equipado com unidade de luz adicional (TPU). As plântulas foram dispostas em uma cuba de acrílico de 20x30cm de comprimento, contendo uma lâmina de água. As imagens geradas foram avaliadas em duas plantas de cada placa, determinando-se as seguintes variáveis: comprimento total de raízes (cm), área projetada total (cm^2), área superficial total (cm^2), diâmetro médio (mm), comprimento por volume (cm/m^3) e volume das raízes (cm^3).

2.2 Submissão das plantas de *Setaria viridis* acesso A10.1 ao estresse salino

As sementes de *S. viridis* foram submetidas à quebra de dormência, esterilização, secagem e semeio conforme descrito anteriormente no item 2.1. Foram semeadas 20 sementes em cada placa de Petri, as quais foram mantidas em uma câmara de crescimento Conviron® modelo Adaptis 1000TC (Controlled Environments Inc., Winnipeg, Canada) sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade de luz de $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Sete dias após o semeio, as plântulas originadas das sementes foram transplantadas individualmente para vasos (0,2 L) contendo 100 g de substrato. Em seguida, as mesmas foram transferidas para uma câmara de crescimento Conviron® modelo PGW40 (Controlled

Environments, Winnipeg, Canada) sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 60% e intensidade de luz de $500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Quando as plantas atingiram o segundo estágio de desenvolvimento (fase vegetativa), aos 7 dias após o transplante, ou seja, mais ou menos 14 dias após a semeadura (MARTINS *et al.*, 2015), as mesmas foram submetidas às doses de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 g de NaCl/dm³ de substrato, em cinco repetições. Tais doses de sal equivaleram a 3, 9, 14, 20, 25 e 31 dSm⁻¹ de condutividade elétrica. Vasos contendo a mesma quantidade de substrato, porém sem plantas, também receberam as mesmas quantidades de NaCl.

O substrato utilizado para esse experimento foi preparado mediante mistura de solo, substrato comercial (Bioplant®) e vermiculita, na proporção (2:1:1; v/v/v). Antes da mistura, a vermiculita, o substrato comercial e o solo foram esterilizados em 121°C a 1 atm por 30 minutos.

O sal foi aplicado por meio de uma solução salina diluída. A quantidade de água utilizada para a dissolução do sal foi padronizada para atingir a capacidade de campo do substrato. Tal procedimento foi um meio de assegurar que não houvesse extravasamento da solução e, portanto, perda de Na⁺ ou Cl⁻. Uma vez que o sal foi totalmente dissolvido, a solução foi uniformemente aplicada na superfície do substrato.

A manutenção diária do conteúdo de água no substrato foi realizada pela reposição de água evapotranspirada utilizando-se água deionizada até o limite da capacidade de campo. As plantas permaneceram sob estresse salino por 12 dias. Oito dias após a aplicação do sal no substrato, foram coletadas duas plantas de cada tratamento para a determinação do peso, o qual foi adicionado ao peso final do vaso, visando corrigir o cálculo da quantidade diária de água necessária para fazer com que o substrato retornasse a 100% da capacidade de campo

Doze dias após a aplicação da solução salina, o substrato contido em cada vaso plástico, com diferentes concentrações de NaCl, foi succionado com o auxílio de uma bomba de vácuo Büchi® modelo V-700 (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), para remoção de amostras de extrato aquoso. Estas amostras foram utilizadas para determinar a condutividade elétrica e o potencial hídrico (Ψ_w), usando um medidor de condutividade Hanna modelo HI98311 (Hanna Instruments, Rhode Island, USA) e um medidor de potencial hídrico Decagon modelo WP4C (Decagon Devices, Pullman, EUA) respectivamente.

A avaliação das plantas sob estresse salino foi realizada através da medição das trocas gasosas, utilizando-se o analisador de gases por infravermelho ADC modelo LCpro-SD (ADC Bioscientific, Hoddesdon, Reino Unido). A radiação fotossinteticamente ativa foi configurada para $1,500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, o CO₂ no interior da câmara foi mantido em torno de $400\ \mu\text{mol CO}_2$

mol⁻¹ e a temperatura fixada em 25°C. As seguintes variáveis foram obtidas: *A* - Taxa de assimilação líquida de CO₂ (μmol de CO₂ m⁻²s⁻¹); *g_s* - taxa de condutância estomática ao vapor d'água (mol de H₂O m⁻²s⁻¹); *E* - taxa de transpiração (mmol de H₂O m⁻²s⁻¹); e *C_i* - concentração intracelular de CO₂ (μmol de CO₂ mol⁻¹). As avaliações foram realizadas na folha mais jovem, completamente expandida.

As plantas foram avaliadas pela técnica de fluorescência de clorofila (Método de Pulso de Saturação), usando um fluorímetro por imagem Walz modelo IMAGING-PAM Maxi (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha), impulsionado pelo software ImaginWin versão 2.40b. Foi utilizada uma abordagem de curva de indução. A cabeça de iluminação IMAG-MAX/L LED e uma câmera IMAGMAX/K4 CCD foram montadas em uma barra de metal de 15 mm de diâmetro no suporte opcional, de forma que o sensor de medição ficou a uma distância padrão de 18,5 cm para todas as plantas. As seguintes configurações foram usadas: luz de medição = 1; pulso de saturação = 10 (2800 μmol/ m² /s); ganho = 1; amortecimento = 2; ganho vermelho = 25; intensidade vermelha = 4; intensidade NIR = 7; fator F_m = 1,055; fator F = 0,999; luz actínica = 9. A curva de indução teve 315 s de duração e se iniciou pela medida de F_o e F_m, sendo a luz actínica ligada após 40 s, aplicando-se um pulso de saturação a cada 20 s. As medidas foram realizadas em plantas mantidas no escuro por 30 min, na mesma folha utilizada para avaliações de trocas gasosas. Os parâmetros avaliados foram: F_m; F_o; Y (II); F_v/F_m; F; Y (NPQ); Y (NO); NPQ; q_N; q_P; q_L e ETR. Após a medição dos parâmetros iniciais, todos os parâmetros derivados foram calculados pelo software. Para isso, uma área de interesse (AOI) que não englobou a nervura central foi marcada. As medições ocorreram diariamente durante 12 dias consecutivos.

Para a análise de pigmentos, utilizou-se uma câmera hiperespectral Resonnon Pika XC (Resonon, Bozeman, MT, EUA) que foi acionada pelo software Spectronon versão 2.1 para escanear as folhas. O sistema foi composto pela câmera hiperespectral, com fase de tradução linear e sistema de iluminação fixo na torre de montagem. Imagens hiperespectrais foram geradas mantendo a mesma distância para todas as plantas e as configurações utilizadas foram realizadas de acordo com as recomendações do manual. Cinco regiões de interesse para o espectro de refletância média foram marcadas em cada planta. A partir da assinatura espectral da amostra, foi possível estimar os teores de pigmentos. Os parâmetros calculados foram índice de clorofila [CI = (R-1 660-R -1 930) x R930] (GITELSON *et al.*, 2005), índice de reflectância fotoquímica [PRI = (R531- R570)/(R531+R570)] (GAMON; PENUELAS; FIELD, 1992; SOUSA *et al.*, 2015) e índice de carotenoides [CRI = (R-1 510) - (R-1 550) x R800] (GITELSON *et al.*, 2002).

A parte aérea das plantas foi colhida aos 12 dias após o início do estresse. O material foi pesado para a determinação da massa fresca e, em seguida, colocado em estufa a 65°C, com ventilação forçada, até a obtenção de massa constante. Por fim, pesou-se novamente para a determinação da massa seca.

2.3 Delineamento experimental e análise dos dados

Para ambos os experimentos, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. No experimento relativo à germinação de sementes e crescimento inicial das plântulas, foram avaliados seis tratamentos (0, 30, 60, 90, 120 e 150 mM NaCl) em 4 repetições. A unidade experimental foi uma placa de Petri contendo 20 sementes.

Para o estudo de resposta ao estresse salino na fase vegetativa, foram utilizados seis tratamentos (0, 2, 4, 6, 8 e 10 g de NaCl/dm³ de substrato), com cinco repetições.

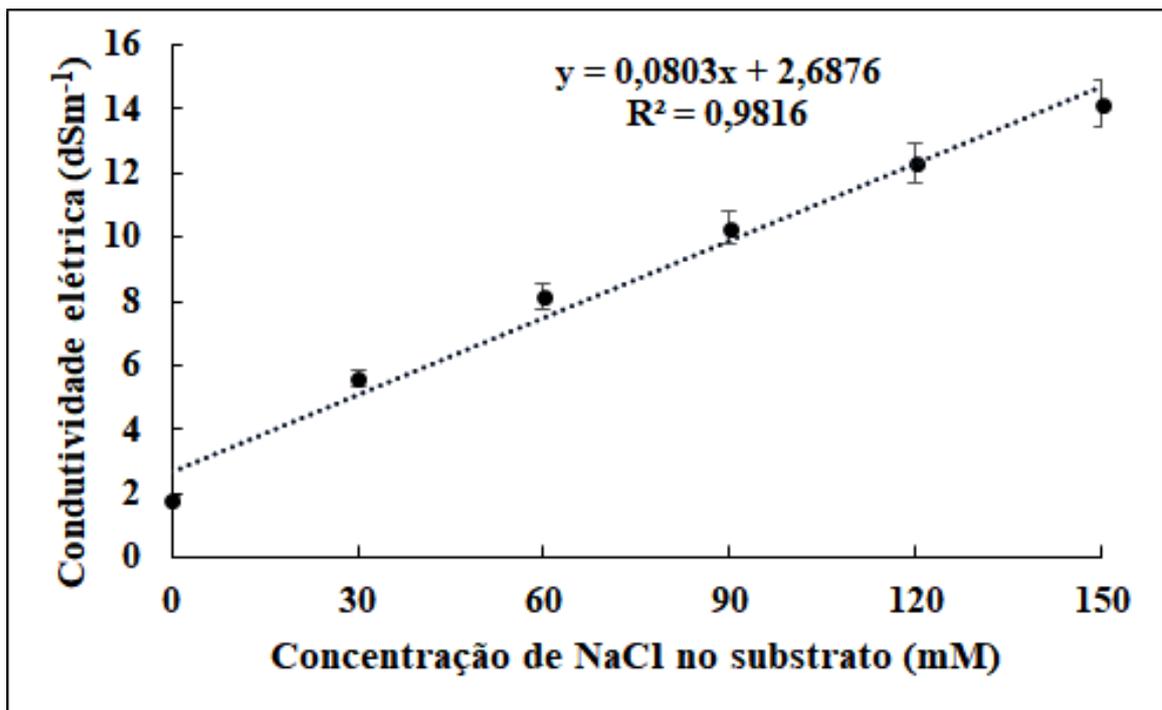
Antes de realizar as análises estatísticas, verificou-se se os dados apresentaram homogeneidade de variância, distribuição normal e independência dos erros, conforme os testes de Variância e Tukey, respectivamente. Uma vez satisfeitos tais requisitos, os dados foram submetidos à análise de variância de acordo com Snedecor e Cochran (1967). Após a análise de variância, ajustaram-se equações de regressão aos dados cujas médias foram significativamente diferentes, utilizando-se o software SISVAR (http://www.dex.ufla.br/~danielff/en/software/sisvar_en.html) (FERREIRA, 2015).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do estresse salino sobre a germinação de sementes e crescimento das plântulas de *Setaria viridis*

O aumento da concentração salina no substrato de germinação levou a um aumento linear na sua condutividade elétrica (Figura 4), a qual atingiu valores próximos a 15 mSm^{-1} , na dose de 150 mM de NaCl. Como consequência, a percentagem de germinação de sementes diminuiu linearmente. Caiu de praticamente 100% no controle para cerca de 70% na concentração de 150 mM de NaCl (Figura 5). Porém, o efeito mais drástico do aumento da concentração salina no substrato ocorreu no crescimento das plântulas.

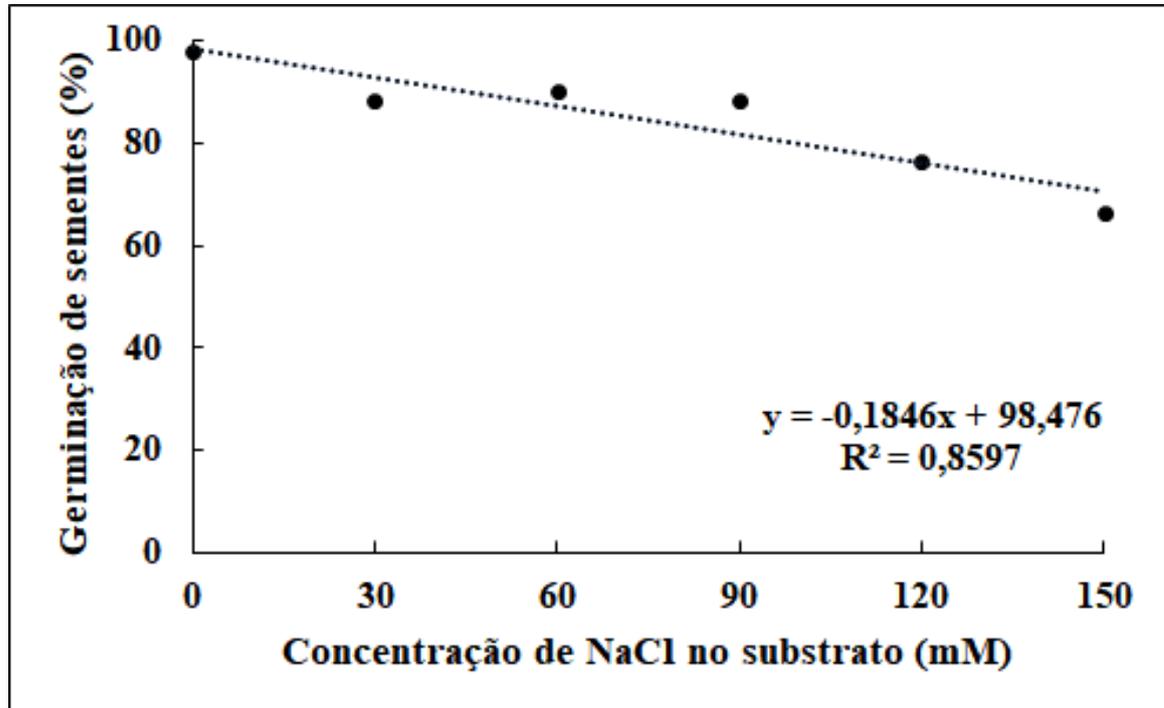
Figura 4 - Condutividade elétrica do substrato de germinação de sementes de *S. viridis* em função da concentração de NaCl



Legenda: A variável analisada seguiu um padrão de modelo linear significativo ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2020).

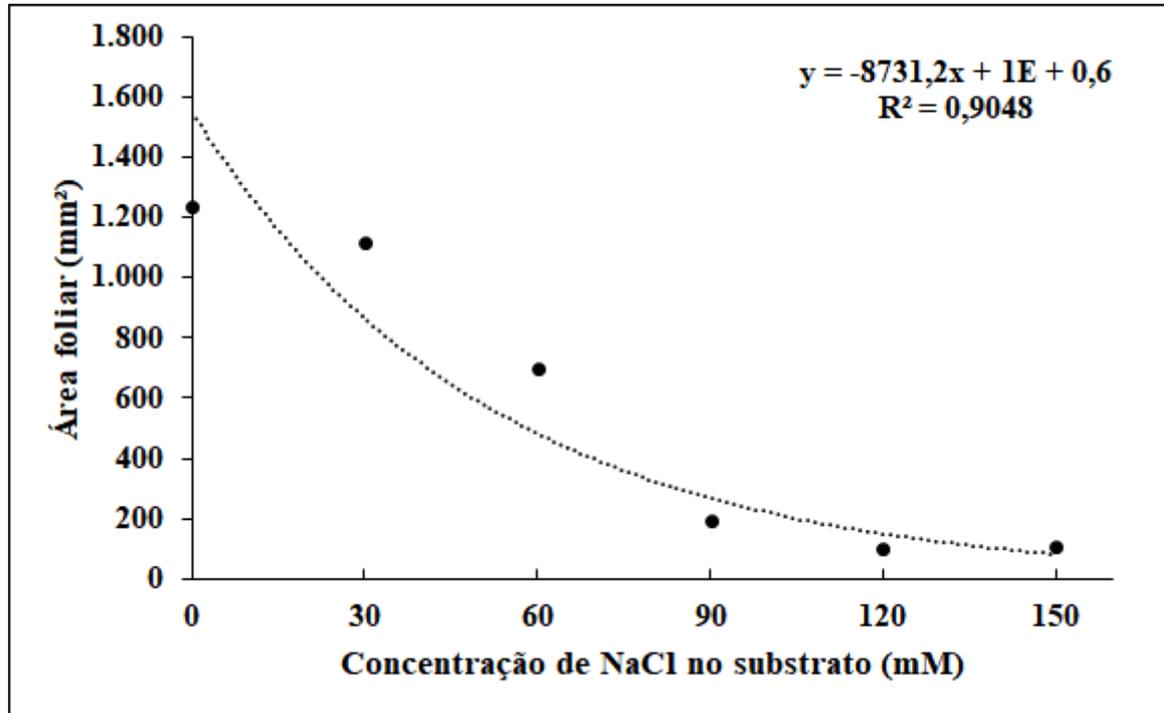
Figura 5 - Percentagem de germinação de sementes de *Setaria viridis* em função da concentração de NaCl no substrato



Legenda: A variável analisada seguiu um padrão de modelo linear significativo ($p \leq 0,05$).
Fonte: Da autora (2020).

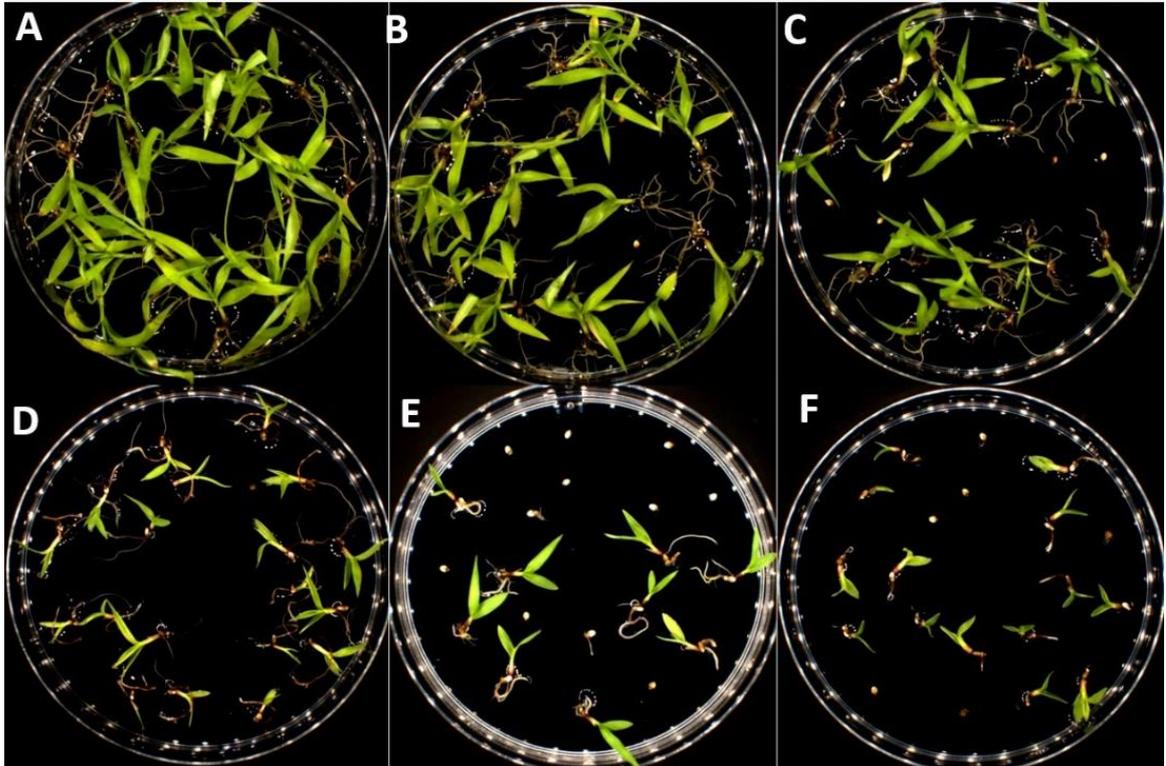
A parte aérea das plântulas de *S. viridis* foi completamente afetada pelo aumento da concentração salina no substrato. Tal efeito foi tão forte que, a partir de 90 mM de NaCl no substrato, as plantas estressadas tinham, em média, apenas 10% da área foliar das plantas controle (Figura 6). Visualmente, foi possível observar as diferenças tanto por imagens digitais (Figura 7) quanto por imagens de fluorescência da clorofila (Figura 8).

Figura 6 - Área foliar de plântulas de *Setaria viridis* em função da concentração de NaCl no substrato aos nove dias após o semeio



Legenda: A variável analisada seguiu um padrão de modelo quadrático significativo ($p \leq 0,05$).
Fonte: Da autora (2020).

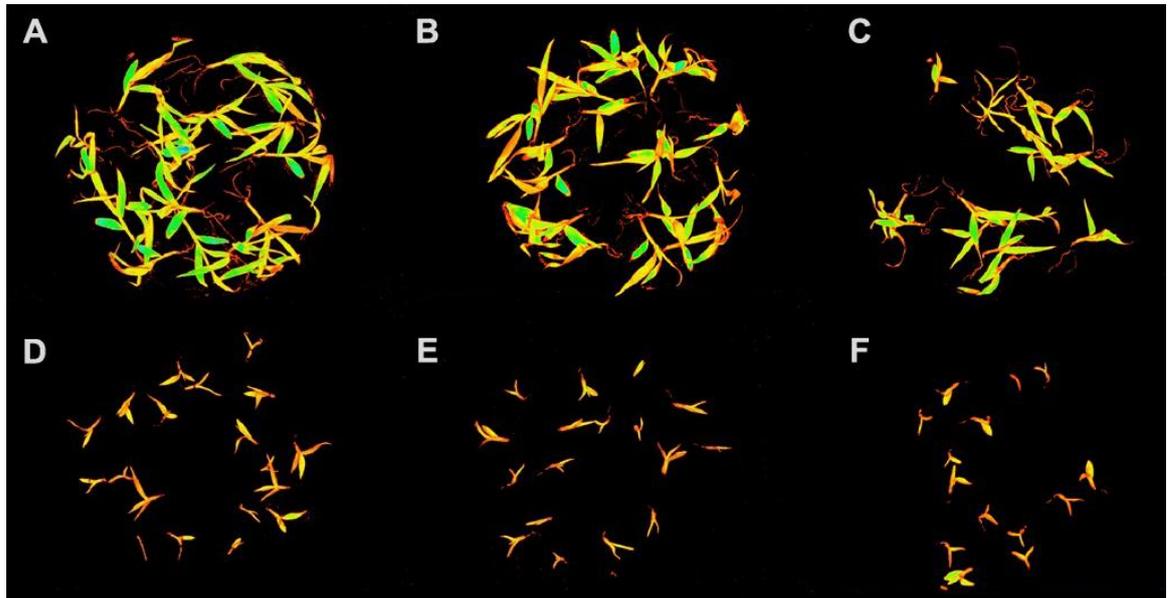
Figura 7 - Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de germinação sobre o aspecto visual da parte aérea de plântulas de *S. viridis* aos 9 dias após o semeio



Legenda: Imagem digital de plântulas de *S. viridis* germinadas em placas de Petri (A) 0 mM; (B) 30 mM; (C) 60 mM; (D) 90 mM; (E) 120 mM; (F) 150 mM de NaCl.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 8 - Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre a fluorescência máxima (Fm) em plântulas de *S. viridis* aos 9 dias após o semeio

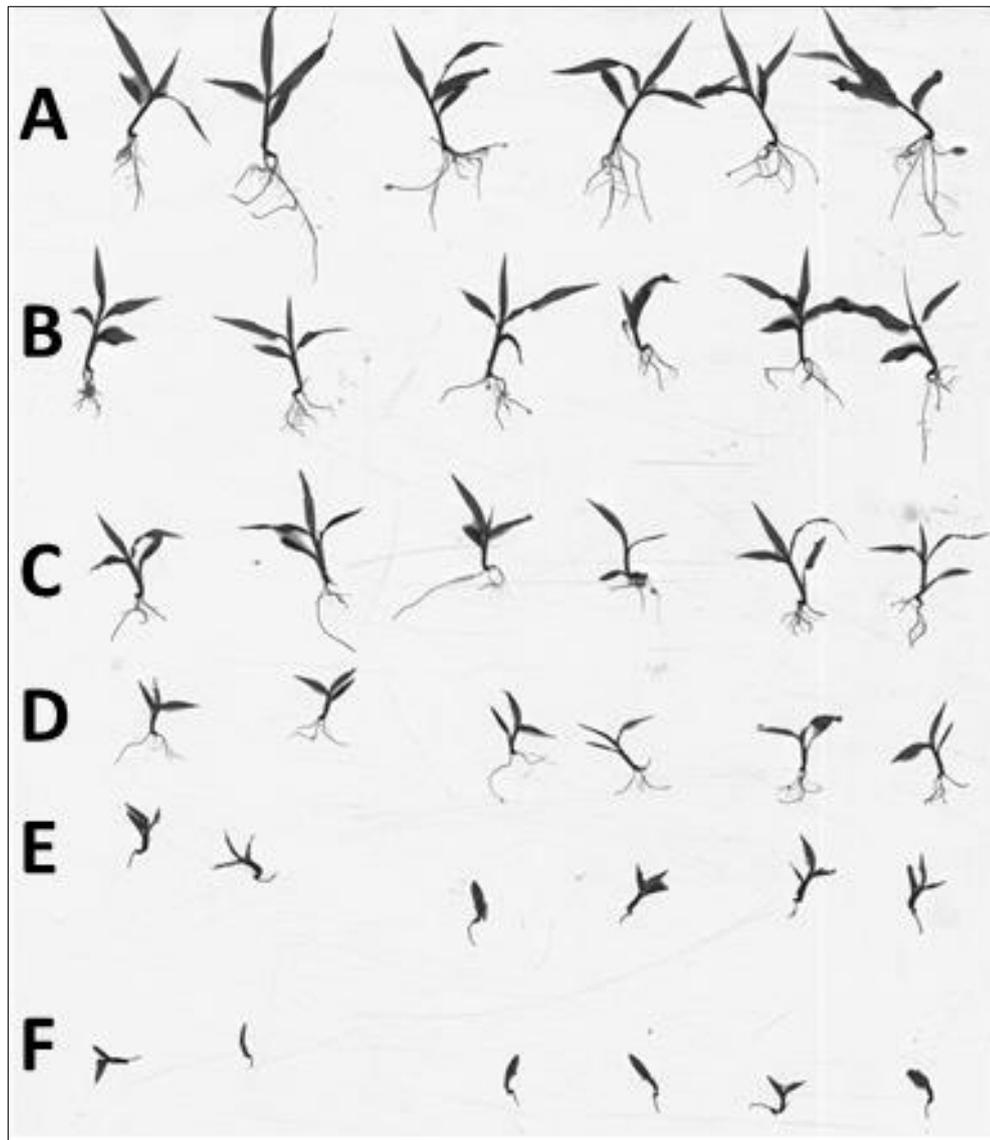


Legenda: Imagem derivada da técnica fluorescência da clorofila por imagem (método do pulso de saturação). Os valores dos dados relativos a cada planta na imagem correspondem ao parâmetro fluorescência máxima (Fm) e podem ser mapeados com o auxílio da falsa barra de cores localizada abaixo. Concentração de NaCl: (A) 0 mM. (B) 30 mM. (C) 60 mM. (D) 90 mM. (E) 120 mM. (F) 150 mM.

Fonte: Da autora (2020).

Visualmente, o aumento da concentração salina no substrato provocou uma redução drástica no tamanho do sistema radicular das plântulas de *Setaria viridis* (Figura 9). As variáveis mais afetadas foram o comprimento por volume, o comprimento total e o volume, com uma queda de 95,41, 89,69% e 89,65, respectivamente. A variável menos afetada foi o diâmetro médio, que apresentou uma queda de apenas 30,19% (Figura 10).

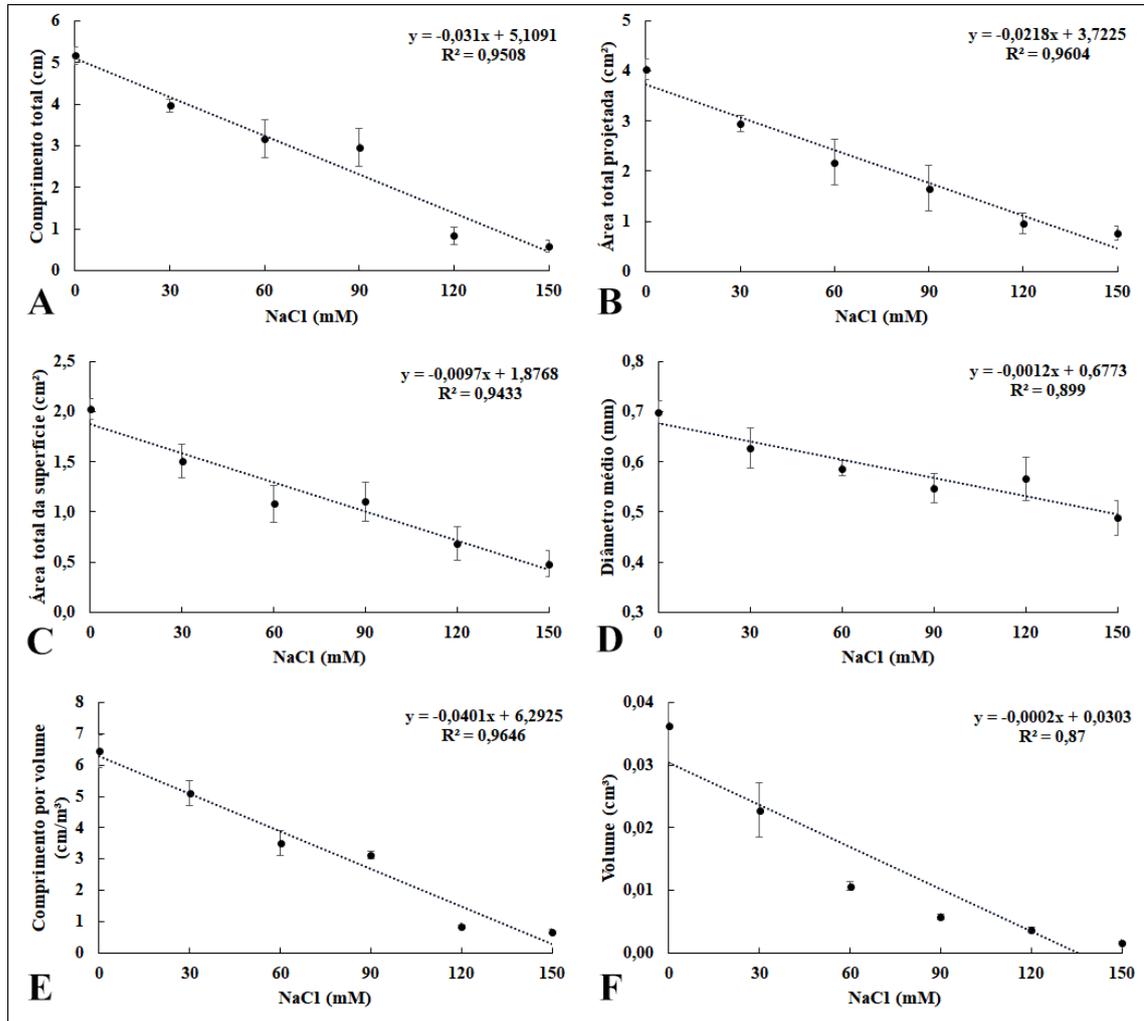
Figura 9 - Efeito visual do aumento da concentração de NaCl no substrato de germinação sobre o sistema radicular de plântulas de *S. viridis* aos nove dias após o semeio



Legenda: Imagem obtida a partir do escaneamento das plântulas realizado pelo Winrhizo. Concentração de NaCl: (A) 0 mM. (B) 30 mM. (C) 60 mM. (D) 90 mM. (E) 120 mM. (F) 150 mM.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 10 - Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de germinação sobre as variáveis morfológicas em raízes de plântulas de *S. viridis*



Legenda: (A) comprimento total (cm). (B) área total projetada (cm²). (C) área total da superfície (cm²). (D) diâmetro médio (mm). (E) comprimento por volume (cm/mm³). (F) volume (cm³). Todas as variáveis analisadas seguiram um padrão de modelo linear significativo ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2020).

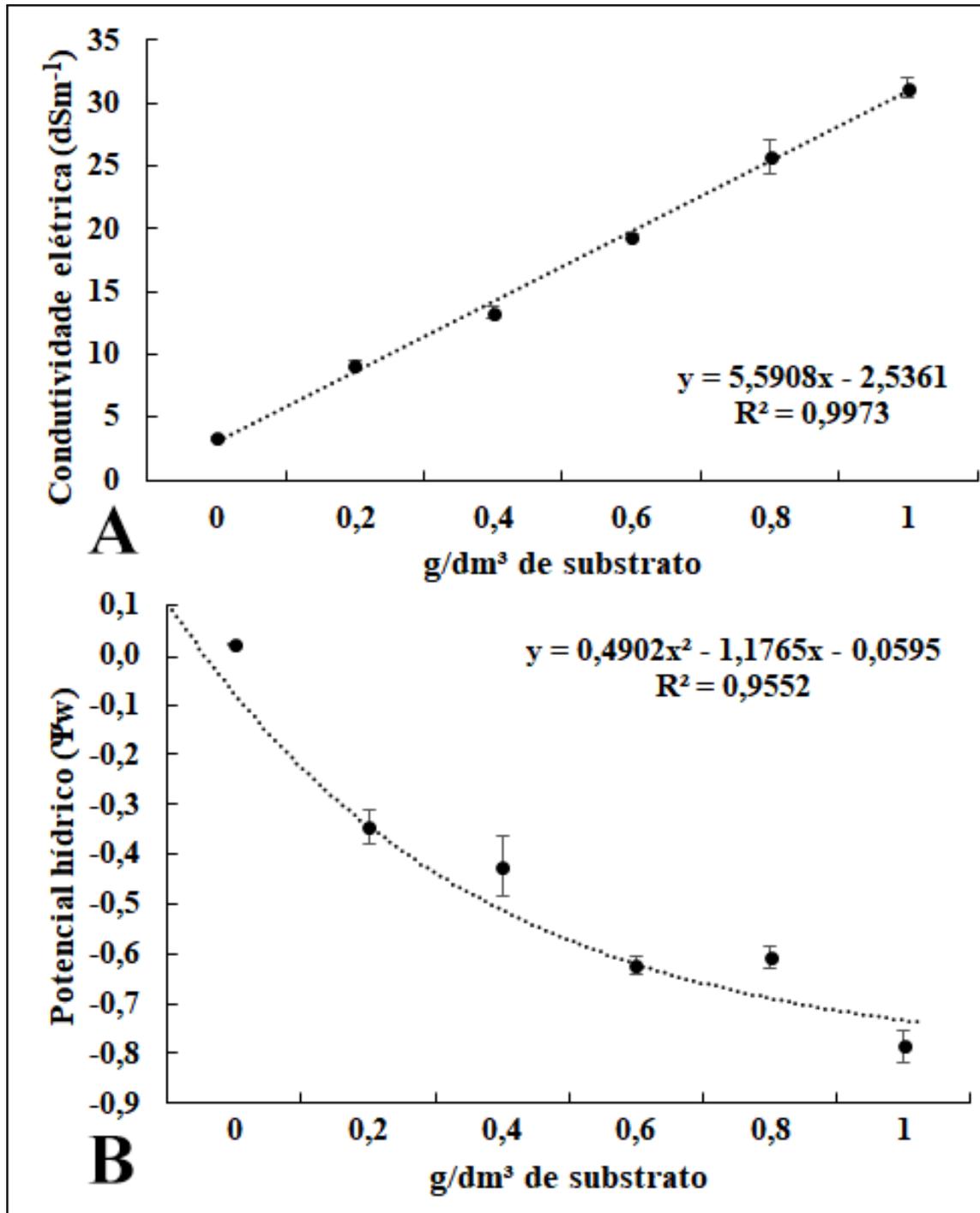
3.2 Efeitos do estresse salino sobre plantas de *Setaria viridis* acesso A10.1 no segundo estágio de desenvolvimento

O aumento nos níveis de NaCl no substrato de cultivo das plantas levou a um aumento proporcional na condutividade elétrica (Figura 11A) e redução no potencial hídrico (Figura 11B) do extrato de saturação. As doses de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 g de NaCl/dm³ de substrato elevaram a condutividade elétrica para 3, 9, 14, 20, 25 e 31 dSm⁻¹. O substrato que não recebeu a adição de NaCl, representado pelo nível salino de 0,0 g de NaCl, apresentou CE superior a zero dS m⁻¹, o que pode ser atribuído ao efeito iônico dos sais presentes nos produtos químicos utilizados para fertiliza-lo.

Devido à robustez do protocolo de salinização utilizado, no qual havia um controle total da quantidade de sal e da disponibilidade hídrica em cada tratamento, as taxas de evaporação (Figura 12A) e evapotranspiração (Figura 12B) reais foram capazes de discriminar os níveis salinos no substrato. Assim, as maiores taxas de evaporação e evapotranspiração ocorreram nos vasos controle, enquanto à medida que aumentaram as doses de NaCl no substrato ambas as taxas diminuíram proporcionalmente. Com o crescimento das plantas ao longo do período experimental, as diferenças nas taxas de evapotranspiração tornaram-se mais nítidas. Isto ocorreu por que as diferenças no tamanho das plantas devido ao estresse salino tornaram-se maiores (Figura 13).

Nas plantas controle, as variáveis de fluorescência da clorofila mantiveram-se relativamente estáveis ao longo do período de avaliação. Em geral, a partir da adição de 4 g de NaCl/dm³ de substrato, as folhas das plantas de setária começaram a apresentar problemas no aparato de captura e utilização da luz. Houve redução nos valores de fluorescência máxima no escuro (Fm), efetivo rendimento quântico do fotossistema II [Y(II)] e máximo rendimento quântico do fotossistema II (Fv/Fm). Por outro lado, houve aumento nos valores de fluorescência inicial no escuro (Fo), e no rendimento quântico da dissipação regulada [Y(NPQ)] e não regulada [Y(NO)] da energia da luz (Figura 15). Tais respostas se acentuaram ao longo do período de estresse, principalmente nas doses de 6 a 10g de NaCl/dm³ de substrato, provocando a morte de 70% e 90% das plantas, respectivamente. Na dose de 1 g de NaCl, houve 100% de mortalidade, a partir do sexto dia de estresse.

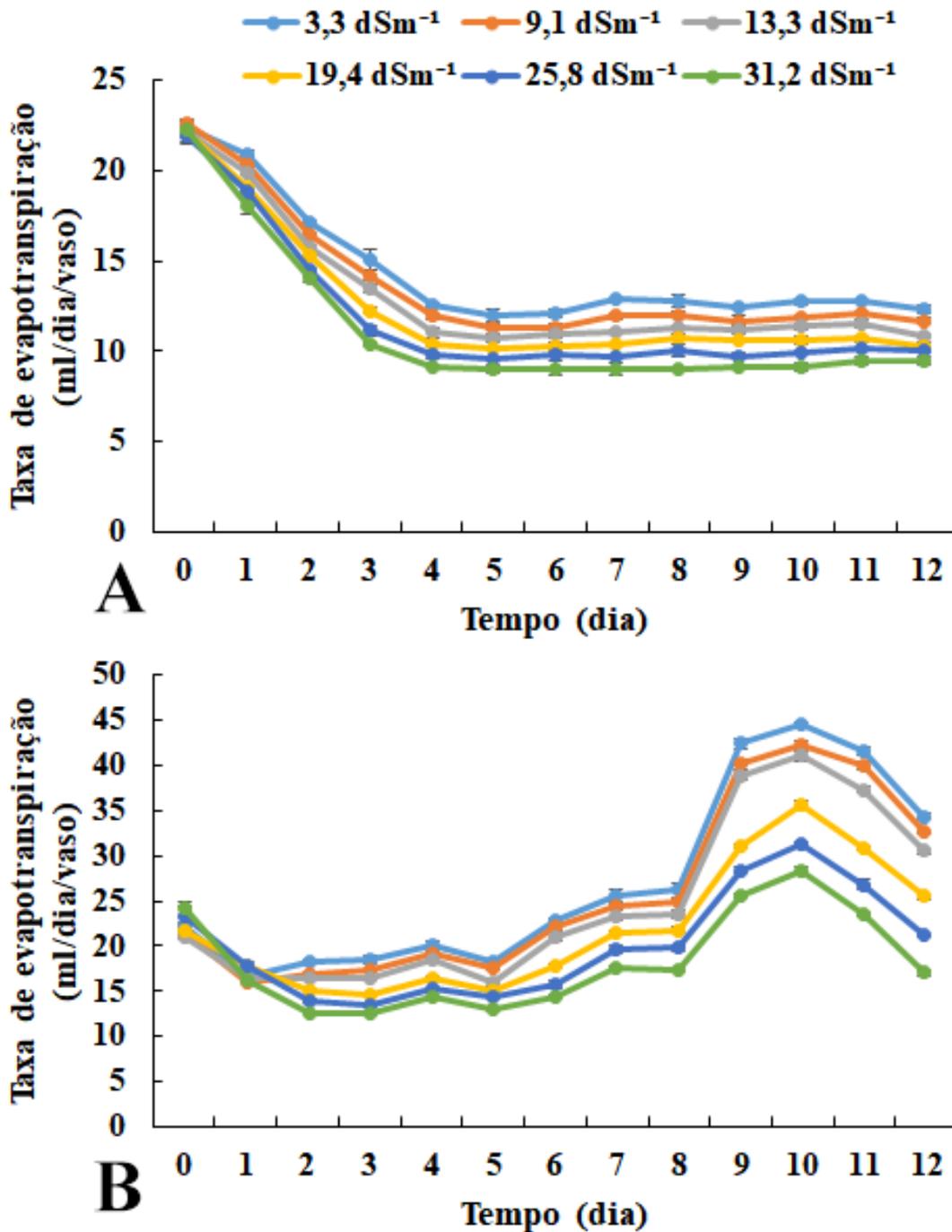
Figura 11 - Efeitos do aumento da concentração de NaCl nas variáveis de condutividade elétrica (A) e o potencial hídrico (B) do extrato de saturação do substrato de cultivo das plantas de *Setaria viridis*



Legenda: (A) Condutividade elétrica de cada nível salino ao final do período experimental. (B) Potencial hídrico de cada nível salino ao final do período experimental. Os valores representam uma média de 5 repetições. Foi verificado que em (A) seguiu-se um padrão de modelo linear significativo ($p \leq 0,05$), e em (B) seguiu-se um padrão de modelo quadrático significativo.

Fonte: Da autora (2020).

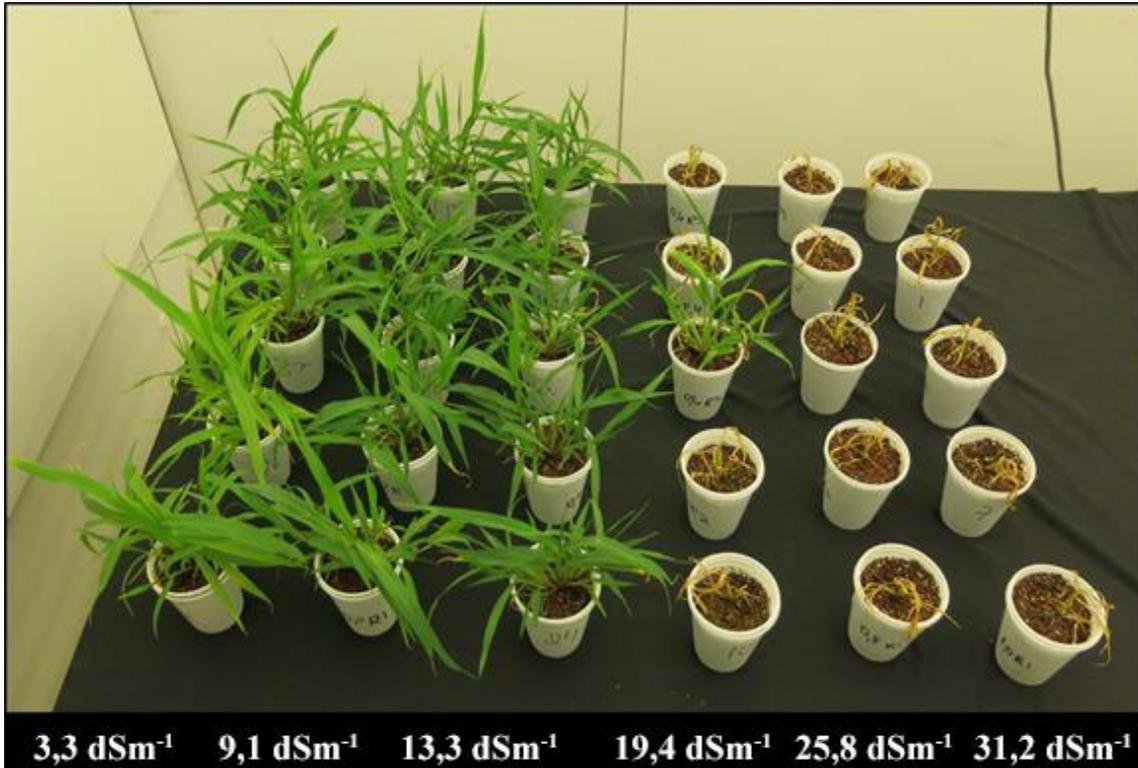
Figura 12 - Taxa diária de perda de água em função de diferentes concentrações de NaCl no substrato de cultivo



Legenda: (A) Taxa de evaporação de água do substrato, os valores representam uma média de 3 repetições. (B) Taxa de evapotranspiração das plantas, os valores representam uma média de 5 repetições. As barras indicam o erro padrão da média. Nos locais onde as barras de erro não aparecem é porque elas são menores do que os símbolos.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 13 - Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre o aspecto visual de plantas de *Setaria viridis* na fase vegetativa



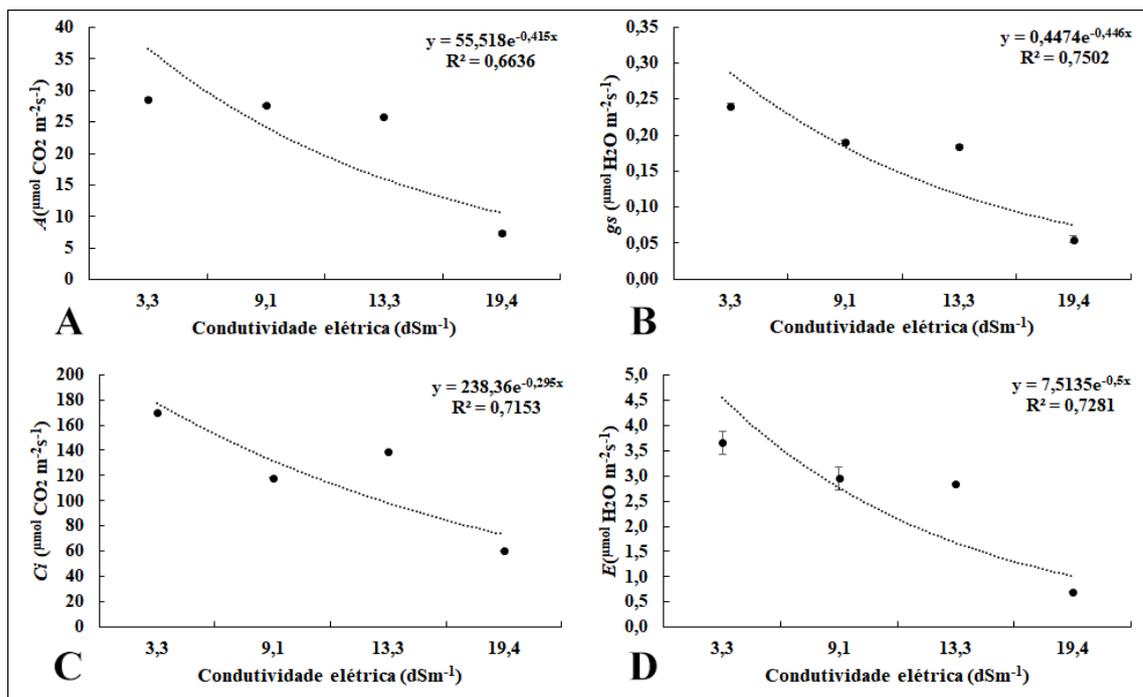
Legenda: Imagem digital RGB de plântulas após 12 dias submetidas ao estresse salino. (0, 2, 4, 6, 8, 10 g NaCl/dm³ de substrato).

O aumento dos níveis de salinidade no substrato provocou queda linear nas variáveis de trocas gasosas (Figura 14) nas folhas de plantas de *Setária*.

O índice de clorofila (CI), o índice de refletância de carotenoides (CRI) e o índice de refletância fotoquímica (PRI) foram eficientes em discriminar as plantas de setária com base nas doses de sal aplicadas ao substrato de cultivo. Praticamente não houve diferenças entre as variáveis antes da aplicação do estresse salino (tempo zero). No entanto, sob estresse, foi observada uma queda nos valores de CI, CRI e PRI em função das doses de sal adicionadas ao substrato (Figura 16).

Por fim, houve queda linear no acúmulo de biomassa fresca e seca na parte aérea das plantas de setária na medida em que se aumentaram as doses de NaCl (Figura 17).

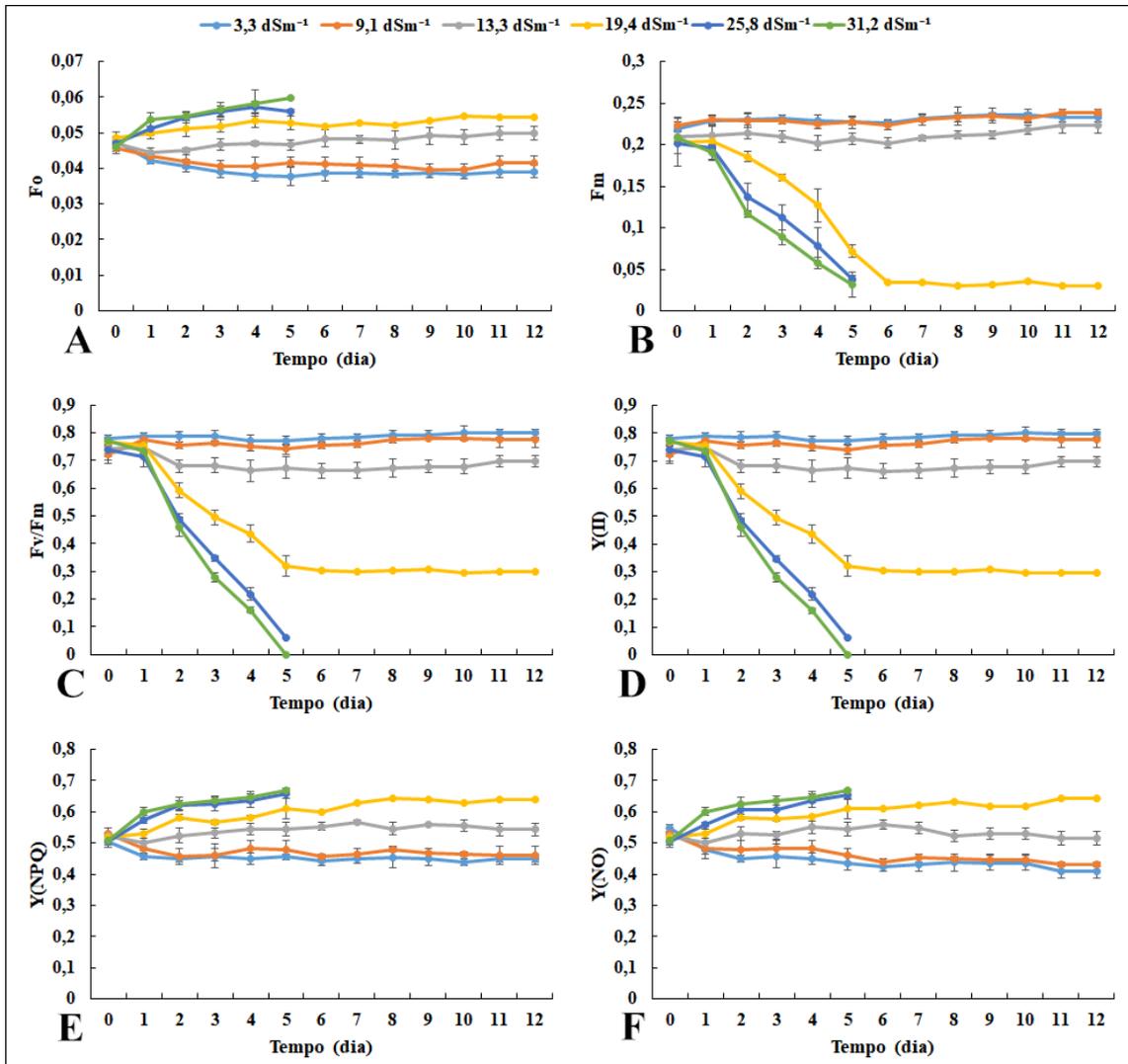
Figura 14 - Mudanças nas variáveis de trocas gasosas em plantas de *Setaria viridis* em função de concentrações crescentes de NaCl no substrato de cultivo



Legenda: (A) Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A). (B) Taxa de condutância estomática ao vapor de água (g_s). (C) Concentração intercelular de CO₂ (C_i). (D) Taxa de transpiração estomática (E). Os valores representam a média de 5 repetições. Em todas as variáveis analisadas seguiu-se um padrão de modelo quadrático significativo ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2020).

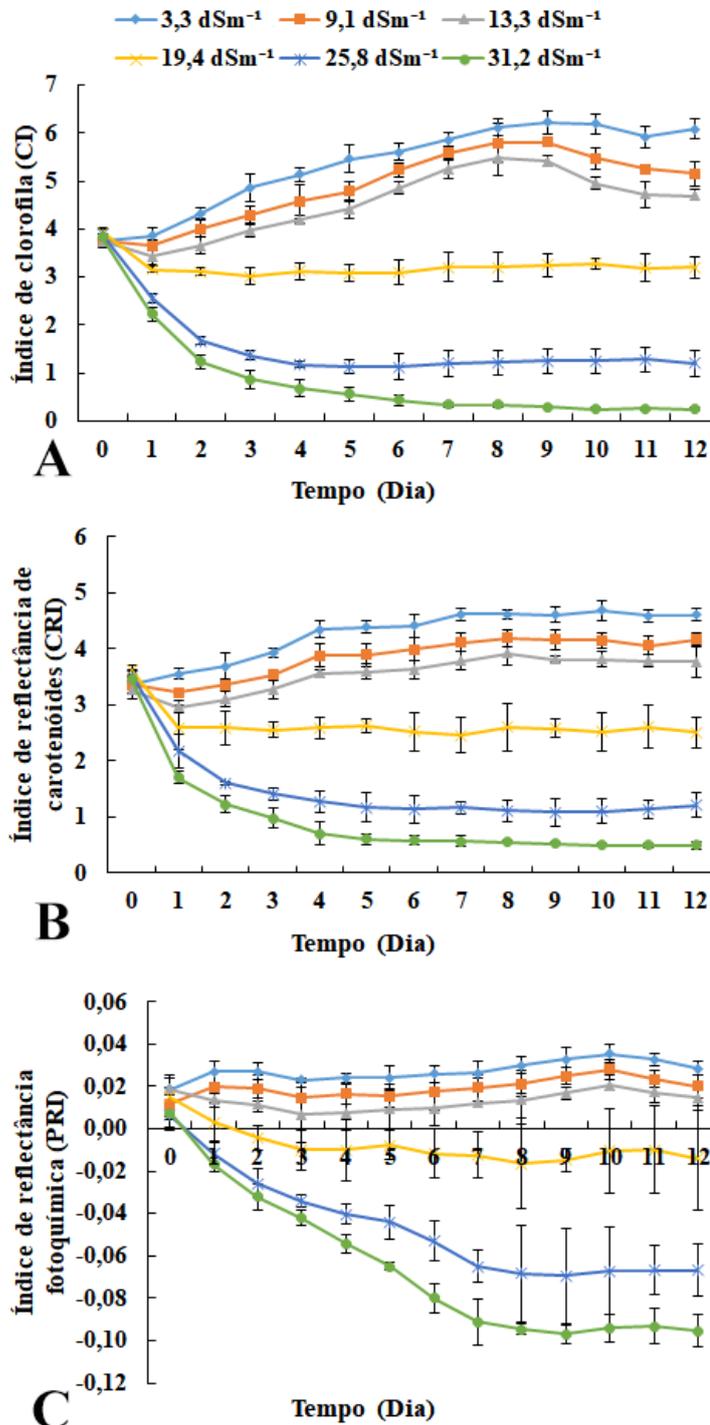
Figura 15 - Efeitos do aumento de concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre as variáveis derivadas da técnica de fluorescência da clorofila (método do pulso de saturação)



Legenda: (A) Fo: rendimento mínimo de fluorescência em folhas adaptadas ao escuro; (B) Fm: rendimento máximo de fluorescência na folha adaptada ao escuro; (C) Fv/Fm: rendimento quântico máximo de PSII; (D) Y(II): rendimento quântico efetivo do PSII; (E) Y(NPQ): rendimento quântico da dissipação de energia regulada; e (F) Y(NO): rendimento quântico da dissipação de energia não regulada. As plantas submetidas aos tratamentos 0.8 e 1.0 g de NaCl/dm³ de solo morreram entre os dias 5 e 6; não sendo, portanto, coletados dados dessas plantas a partir do sexto dia.

Fonte: Da autora (2020).

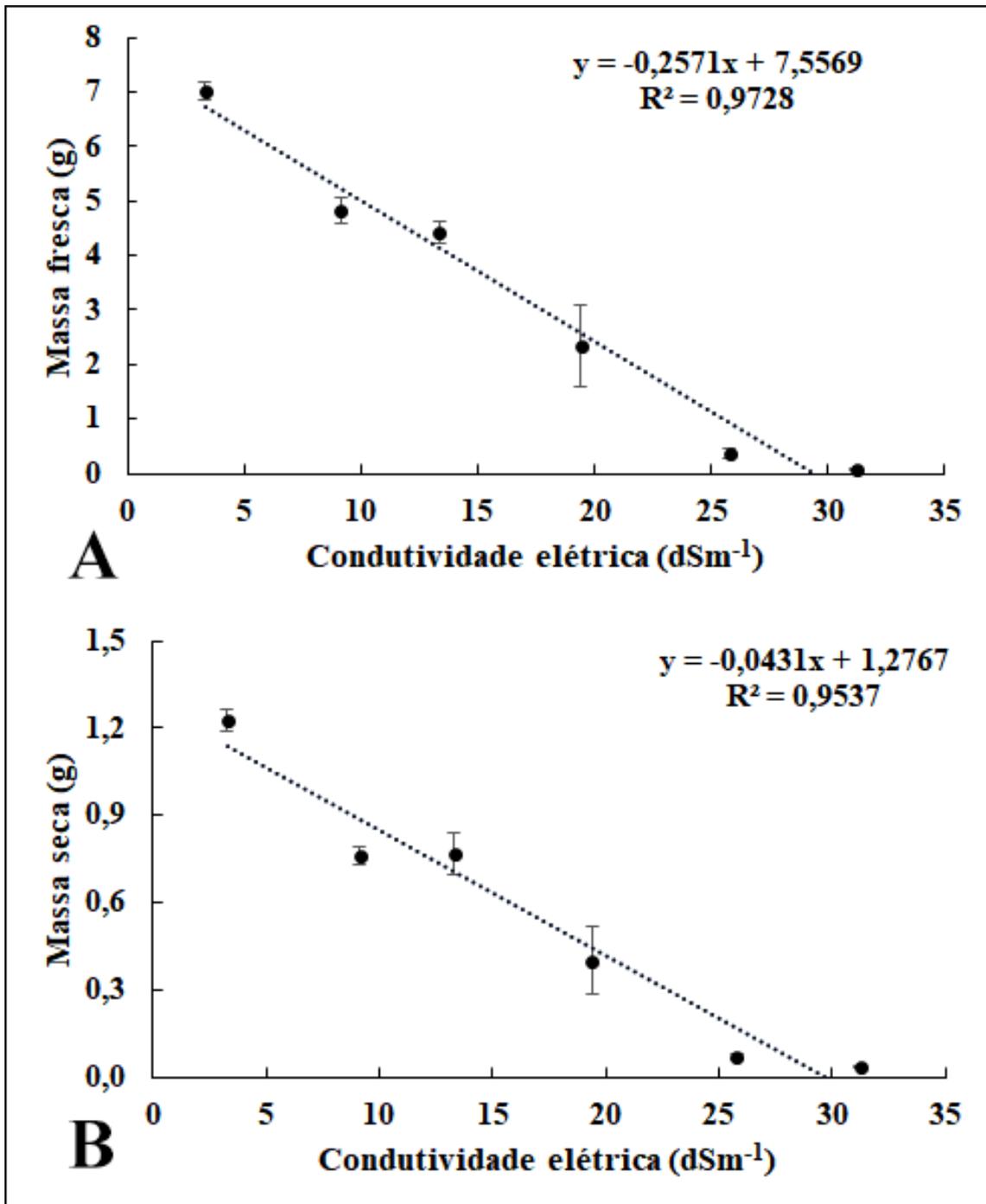
Figura 16 - Efeitos do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre o índice de clorofila (A), o índice de refletância dos carotenóides (B) e índice de refletância fotoquímica (C) em plantas de setária na fase vegetativa



Legenda: Os valores representam uma média de 5 repetições. As barras representam o erro padrão da média. Onde as barras não aparecem é porque elas são menores do que os símbolos.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 17 - Efeitos do aumento de concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre a biomassa fresca (A) e seca (B) da parte aérea de plantas de *Setária viridis*



Legenda: Os valores representam uma média de 5 repetições. Foi verificado que em ambas as variáveis seguiu-se um padrão de modelo linear significativo ($p \leq 0,05$).

Fonte: Da autora (2020).

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeitos do estresse salino sobre a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas do acesso A10.1 de *Setaria viridis*

O estresse salino, quando aplicado a espécies vegetais sensíveis, em geral, retarda e reduz a germinação das sementes, além de restringir o crescimento das plântulas (CHARTZOULAKIS; LOUPASSAKI, 1997; GUO *et al.*, 2012). A princípio, o efeito dos sais no solo resulta na redução do seu potencial hídrico, o que interfere na absorção de água pela semente (PEREIRA *et al.*, 2012). Posteriormente, a entrada de solutos na semente pode levar à toxicidade iônica, a alterações na composição dos lipídios e à interferência no funcionamento da membrana plasmática, afetando, por exemplo, a permeabilidade e o transporte (BLISS *et al.*, 1984; CORDEIRO *et al.*, 2014).

As sementes de *S. viridis* acesso A10.1 apresentaram uma taxa de germinação considerável, mesmo em 150 mM de NaCl, ou seja, cerca de 15 dSm⁻³ de condutividade elétrica, que representa aproximadamente 1/3 da concentração salina da água do mar. No entanto, sabe-se que a germinação de sementes é relativamente tolerante à salinidade (FLOWERS, 2004). Mesmo acessos de *Arabidopsis* sensíveis ao sal conseguem germinar até 125 mM de concentração salina no substrato (GALPAZ; RAYMOND, 2010). Em experimentos realizados com espécies de plantas da família Poaceae, da qual *S. viridis* faz parte, os resultados não foram muito diferentes. Sementes de capim-arroz, por exemplo, ao serem submetidas a concentrações crescentes de sal, apresentaram taxa de germinação superior a 80%, mesmo quando submetidas a 150 mM de NaCl. Nesta espécie, a germinação foi inibida completamente apenas em 400 mM de NaCl (SADEGHLOO *et al.*, 2013). No milho, foram realizados experimentos com concentrações de até 200 mM de NaCl e KCl, mas nenhum dos sais afetou diretamente a germinação das sementes (CONUS *et al.*, 2009).

Muscolo, Panuccio e Eshel, (2013) afirmaram que grande parte das culturas apresenta uma maior intolerância à salinidade no crescimento inicial pós-germinação. Existem pesquisas que mostram que, mesmo espécies que apresentam germinação elevada em meio salino, em geral sofrem redução na área foliar, no número de folhas, na altura das plântulas e na biomassa da parte aérea (CAVALCANTI *et al.*; CHARTZOULAKIS; LOUPASSAKI, 1997; CONUS *et al.*, 2009). Portanto, a percentagem de germinação de sementes não pode ser considerada um bom indicador da tolerância ao estresse salino em plantas (CAVALCANTI *et al.*, 2005a, 2005b; CONUS *et al.*, 2009). Neste estudo, por exemplo, apesar das sementes de setária apresentarem uma taxa de germinação razoável sob estresse salino, o desenvolvimento

inicial das plântulas, considerando raízes e parte aérea, foi altamente prejudicado. Para Galpaz e Raymond (2010), a resposta ao estresse salino pode ser melhor quantificada utilizando-se a percentagem de redução no comprimento das raízes, em relação ao controle. No caso de *Setaria*, tanto raiz quanto parte aérea foram drasticamente afetadas pelo estresse salino.

4.2 Efeitos do estresse salino sobre o segundo estágio de desenvolvimento de *Setaria viridis* acesso A10.1

A água disponível às plantas está diretamente relacionada aos sais dissolvidos nela, os quais aumentam a sua condutividade elétrica (Figura 11A), diminuem o seu potencial osmótico (Figura 11B) e, conseqüentemente, dificultam e reduzem a sua absorção (PARIHAR *et al.*, 2015; SILVA, 2019). Neste aspecto, o efeito osmótico do sal foi marcante tanto no substrato nu quanto no substrato cultivado com plantas, pois quanto maior a concentração de sal, menores as taxas de evaporação (Figura 12A) e evapotranspiração (Figura 12B), respectivamente. A redução nas taxas de evapotranspiração ocorreu basicamente pela queda nas taxas de trocas gasosas como um todo (Figura 14), especialmente nas taxas de condutância estomática (Figura 14B) e transpiração (Figura 14D).

Estudos com microscopia eletrônica têm mostrado que, sob estresse salino, ocorre a desorganização da estrutura dos tilacóides (PARIDA; DAS, 2005). Neste trabalho, a presença de NaCl no substrato, a partir de 4 g/dm³ (CE aproximada de 14mS m⁻¹), provocou danos ao sistema de membrana dos cloroplastos e, conseqüentemente, aos centros de reação e aos complexos de antenas de captação de luz do fotossistema II. Tal inferência se deveu, tanto pelo aumento em F_0 (Figura 15A) quanto pela redução em F_m (Figura 15B) e F_v/F_m (Figura 15C). Conseqüentemente, houve queda no fluxo de elétrons no esquema em Z da fotossíntese, o qual foi proporcional à concentração salina no substrato (Figura 15D). A energia da luz não aproveitada para fluir os elétrons no esquema em Z foi direcionada para a geração de calor (Figura 15E) e parte foi reemitida como fluorescência (Figura 15F). O aumento desta última variável sob estresse salino significa que o aparato fotoquímico não foi capaz de dissipar a energia da luz de forma regulada e, por isso, pode ter entrado em colapso, contribuindo para causar a morte das plantas.

A salinidade afeta o conteúdo de clorofila das plantas (PAK *et al.*, 2009). A queda nos teores de pigmentos foliares, representados por CI e CRI (Figura 16 A e B) é um resultado recorrente na literatura para diversas espécies vegetais que são susceptíveis à salinidade (SHAH; HOUBORG; MCCABE, 2017; SALEH, 2012). Resultados similares foram observados em *Oryza sativa*, quando submetida ao estresse salino. Nesta espécie houve uma

diminuição do teor de clorofila a (33%) e b (41%), com 200 mM de NaCl (AMIRJANI, 2011). Em *Vigna radiata*, 150 mM de NaCl provocou um declínio de 31% nos teores de clorofila (SAHA *et al.*, 2010).

É interessante observar que ao final do período de estresse, a queda no PRI foi proporcional ao estresse salino (Figura 16C), o que indica que as plantas, provavelmente, mantiveram o ciclo das xantofilas funcionando em todas as doses de sal estudadas. A ativação do ciclo das xantofilas é uma resposta observada em algumas espécies halófitas sob estresse salino (QIU *et al.*, 2003; RABHI *et al.*, 2012) e relaciona-se com a proteção do aparato fotossintético contra os danos fotoinibitórios (QIU *et al.*, 2003). No caso de *Setaria viridis* acesso A10.1, o funcionamento do ciclo das xantofilas não foi suficiente para dar vazão ao fluxo de elétrons não aproveitado para a fotossíntese. Caso contrário, não teria ocorrido o incremento na emissão de fluorescência nas doses mais altas de NaCl, conforme pode ser observado pelo aumento em Y(NO) (Figura 15F).

O efeito do estresse salino sobre o acúmulo de biomassa nas plantas muito provavelmente foi relacionado ao efeito osmótico, que teve como consequência o fechamento estomático e a restrição à entrada de CO₂ no mesófilo foliar. A redução de matéria seca devido à alta salinidade é uma resposta comumente citada na literatura para diversas espécies intolerantes (KHAN *et al.*, 2010, 2015; SOUSA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2014).

As alterações visuais mais severas foram observadas nos maiores níveis salinos (6 a 10 g de NaCl/dm³ de substrato), indicando que as plantas de setária toleraram doses de até 4 g de NaCl/dm³ de substrato, sem alterações substanciais que resultassem na morte das mesmas. A partir de 6 g/dm³ de NaCl no substrato, o que equivale à CE do extrato de saturação de aproximadamente 20 dSm⁻¹, as plantas tiveram as suas variáveis afetadas e reduziram drasticamente o crescimento. Segundo Flowers (2004), embora a tolerância das condições salinas pelas plantas seja variável, as espécies de culturas geralmente são intolerantes a um terço da concentração de sais encontrados na água do mar. Portanto, o acesso A10.1 de *Setaria viridis* se comportou como uma planta glicófito.

Nas plantas de *S. viridis*, a rapidez das respostas obtidas permite relacionar a redução no crescimento e, nas doses mais altas, a morte das plantas ao choque osmótico, uma vez que o sal foi adicionado quando as plantas já se encontravam em pleno desenvolvimento. De qualquer forma, as respostas obtidas para as plantas de setária permitem classificá-la como uma planta sensível aos altos níveis de concentrações salinas no substrato, podendo ser utilizada tanto como planta modelo para validação de promotores responsivos ao estresse salino, quanto de genes candidatos de tolerância ao referido estresse. As variáveis medidas

neste trabalho são de fato utilizadas para a avaliação da tolerância de plantas ao estresse salino, a exemplo de trabalhos como Sousa *et al.* (2015); Pak *et al.* (2009); Flowers *et al.* (2014); Santos (2017); Belo Silva (2019).

5 CONCLUSÕES

A germinação de sementes de *Setaria viridis* acesso A10.1 foi pouco afetada pelo estresse salino. Porém, o crescimento inicial das plântulas, expresso com base no tamanho da parte aérea e das raízes, foi altamente prejudicado. O mesmo ocorreu na fase de crescimento vegetativo, em que a parte aérea foi duramente afetada pelo excesso de sal, com base em dados de trocas gasosas, fluorescência da clorofila, teores de pigmentos e produção de biomassa.

Uma vez que seu crescimento como um todo foi duramente afetado pela condutividade elétrica de 15 dSm⁻¹, que é um valor limiar para as glicófitas, nós concluímos que *S. viridis* acesso A10.1 é uma planta sensível à salinidade. Portanto, este acesso pode ser utilizado como planta modelo em estudos de genômica funcional para validar genes candidatos a conferir tolerância aquele estresse.

REFERÊNCIAS

- AMIRJANI, M. R. Effect of Salinity Stress on Growth, Sugar Content, Pigments and Enzyme Activity of Rice. **International Journal of Botany**, v. 7, n. 1, p. 73–81, 1 jan. 2011.
- BELO SILVA, V. N. **Caracterização fenotípica da tolerância de *Portulaca oleracea* L. e *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. à salinidade**. 2019. 324 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- BLISS, R.; PLATT-ALOIA, K.; THOMSON, W. Effects of salt on cell membranes of germinating seeds. **California Agriculture**, v. 38, n. 10, p. 24–25, 1984.
- BRUTNELL, T. P. *et al.* *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. **The Plant cell**, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, 2010.
- BRUTNELL, T. P.; BENNETZEN, J. L.; VOGEL, J. P. Brachypodium distachyon and *Setaria viridis*: Model Genetic Systems for the Grasses. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 66, n. 20, p. 1–20.21, 2015.
- CAVALCANTI, M. L. F. *et al.* Índices ecofisiológicos Índices ecofisiológicos da mamoneira sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 99, p. 66–7066, 2005a.
- CAVALCANTI, M. L. F. *et al.* Tolerância da mamoneira BRS 149 à **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** salinidade: germinação e características de crescimento., n. 99, p. 57–6157, 2005b.
- CONUS, L. A. *et al.* Germinação de sementes e vigor de plântulas de milho submetidas ao estresse salino induzido por diferentes sais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p. 67–74, 2009.
- CORDEIRO, M. A. *et al.* Population differentiation for germination and early seedling root growth traits under saline conditions in the annual legume *Medicago truncatula* (Fabaceae). **American journal of botany**, v. 101, n. 3, p. 488–498, mar. 2014.
- FAO. Salt-affected soils. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**, Rome, 2019. Disponível em: www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-someproblem-soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en
- FAO. The State of Food and Agriculture. Social Protection and Agriculture: Breaking the cycle of rural poverty. **Food and Agricultural Organization of the United Nations**, Rome, 2015.
- FERREIRA. SISVAR. A statistical analysis and design of experiments program. 2015. Disponível em: http://www.dex.ufla.br/~danielff/en/software/sisvar_en.html. Acesso em: 06 jul. 2019.
- FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental botany**, v. 55, n. 396, p. 307-319, 2004.
- FLOWERS, T. J.; MUNNS, R.; COLMER, T. D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. **Annals of botany**, v. 115, n. 3, p. 419-431, 2014.

GITELSON, A. A. *et al.* Remote estimation of canopy chlorophyll content in crops. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 8, p. 1-4, 2005.

GITELSON, A. A. *et al.* Assessing Carotenoid Content in Plant Leaves with Reflectance Spectroscopy. **Photochemistry and photobiology**, v. 75, n. 3, p. 272-281, 2002.

GUO, Y. *et al.* *Thellungilla halophila* is more adaptive to salinity than *Arabidopsis thaliana* at stages of seed germination and seedling establishment. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 4, p. 1287–1294, 13 jul. 2012.

HU, H. *et al.* Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 12987-12992, 2006.

HUANG, P. *et al.* *Setaria viridis* as a model system to advance millet genetics and genomics. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1781, 2016.

KHAN, N. *et al.* Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. **Intl. J. Plant. Biol.**, v. 1, n. e1, 2010. DOI: 10.4081/pb.2010.e1.

CHARTZOULAKIS, K. S.; LOUPASSAKI, M. H. **Effects of NaCl salinity on germination, growth, gas exchange and yield of greenhouse eggplant.** *Agricultural Water Management*, v. 32, n. 3, p. 215-225, March 1997.

LI, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3031–3037, May 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/err096>.

LI, T. *et al.* Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in *Torreyagrandiscv. merrillii* seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, e109492, p. 1-9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109492.

MARTINS, P. K. *et al.* A simple and highly efficient Agrobacterium-mediated transformation protocol for *Setaria viridis*. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 41-44, 2015.

MARTINS P. K., DA CUNHA B. A. D. B., KOBAYSHI A. K., MOLINARI H. B. C. *Setaria viridis* as a Model Plant for Functional Genomic Studies in C4 Crops. *In: KUMAR, S.; BARONE, P.; SMITH M. (ed.). Transgenic Plants: Methods Mol Biol.* New York: Humana Press, 2019. p. 49-65. v. 1864. DOI: 10.1007/978-1-4939-8778-8_4.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Ann. Rev. Plant Biol.**, v. 59, n; 1, p. 651-681, 2008. DOI 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow than bio assays with to bacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PARIDA, A. K.; DASA, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.010.

- PARIHAR, P. *et al.* Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environ Sci Pollut Res.**, v. 22, p. 4056-4075, 2015. DOI: 10.1007/s11356-014-3739-1.
- PEREIRA, M. R. R. *et al.* Influência do estresse hídrico e salino na germinação de *Urochloa decumbens* e *Urochloa ruziziensis*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 537–545, 2012.
- QIU, N.; LU, Q.; LU, C. Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophyll cycle in the salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*. **New Phytologist**, v. 159, n. 2, p. 479-486, 2003.
- RABHI, M. *et al.* Photosynthetic responses to salinity in two obligate halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Tecticornia indica*. **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 39-47, 2012.
- RIBEIRO, M. R. *et al.* Química dos solos salinos e sódicos. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (ed.). **Química e mineralogia do solo**. Parte II - Aplicações. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p. 449-484.
- SADEGHLOO, A.; ASGHARI, J.; GHADERI-FAR, F. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Abutilon theophrasti* e *Echinochloa crus-galli*. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 259–266, 2013.
- SALEH, B. Effect of salt stress on growth and chlorophyll content of some cultivated cotton varieties grown in Syria. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 43, n. 15, p. 1976-1983, 2012.
- SAHA, P.; CHATTERJEE, P.; BISWAS, A. K. NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Indian journal of experimental biology**, v. 48, n. 6, p. 593–600, jun. 2010.
- SANTOS, M. L. **Prospecção e caracterização de genes análogos de resistência (RGAS) em *Elais* spp. e avaliação da tolerância de *Setaria viridis* a estresse salino e de frio**. 2017. 115 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- SERTÃO, M. A. J. **Uso de corretivos e cultivo do capim *Urochloa (Urochloa sambicensis (Hack) Daudy)* em solos degradados do Semi-árido**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil, 2005.
- SHAH, S.; HOUBORG, R.; MCCABE, M. Response of chlorophyll, carotenoid and SPAD-502 measurement to salinity and nutrient stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Agronomy**, v. 7, n. 3, p. 61, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy7030061>
- SOUSA, C. *et al.* Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 660-672, 2015.
- UDAWAT, P. *et al.* Overexpression of a Cytosolic Abiotic Stress Responsive Universal Stress Protein (SbUSP) Mitigates Salt and Osmotic Stress in Transgenic Tobacco Plants. **Front. Plant Sci.**, v. 7, n. 518, p. 1-21, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00518.

WALTER, A.; LIEBISCH, F.; HUND, A. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. **Plant Methods**, v. 11, p. 14, 2015.

ZAMAN, M.; SHAHID, S. A.; HENG, L. **Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques**. New York: Springer, 2018.

CAPÍTULO 3

Prospecção e anotação de genes responsivos a estresse de salinidade em dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caracterização do perfil de expressão gênica mediante emprego de qPCR

RESUMO

Transcritômica é o emprego de distintas técnicas no estudo do transcrito de um organismo. Dentre as técnicas mais utilizadas, o RNA-seq é a que mais se destaca atualmente. RNA-seq é o sequenciamento de cDNAs derivados de transcritos, em larga escala, utilizando plataformas de NGS (Next Generation Sequencing). A análise de dados de RNA-seq permite caracterizar o perfil de expressão gênica *in silico* em uma determinada condição, como o estresse salino, mediante emprego de estratégias de análise de expressão diferencial de genes. O perfil determinado *in silico* precisa ser validado *in vivo*, o que pode ser realizado com a técnica de RT-qPCR. Este trabalho visou à prospecção de genes de *E. guineensis* responsivos a estresse de salinidade, a partir de dados de RNA-seq obtidos em um estudo anterior. Os genes resultantes da prospecção foram analisados funcional e estruturalmente antes de serem submetidos à comparação dos perfis de expressão gênica *in silico* e *in vivo*. Folhas de plantas de dendê submetidas a estresse salino - 2.0 g de NaCl /100 g de substrato, coletadas aos cinco e 12 dias após início do estresse, foram submetidas a extração de RNA total (três plantas por tratamento) cinco e doze dias sob estresse. O mesmo foi feito para três plantas submetidas a 0.0 g de NaCl /100 g de substrato. A plataforma de bioinformática OmicsBox, na sua versão 1.2.4., módulo “transcritomics”, utilizando o “Reference Based Transcriptomics Workflow” com ajustes, foi empregada na seleção dos genes responsivos ao estresse salino, e para gerar o perfil de expressão *in silico* dos genes selecionados. Foram identificados 33 genes diferencialmente expressos quando comparando as amostras com cinco dias de estresse e o controle; e 10 genes diferencialmente expressos quando comparando as amostras com 12 dias de estresse e o controle; utilizando os seguintes critérios de seleção: maior expressão quando estressado em comparação com o controle, $FDR \leq 0.01$ e $\log FC \geq 5$. Seis genes eram comuns aos dois grupos; e, tendo como base os perfis de expressão dos mesmos *in silico*, três destes foram escolhidos genes para gerar o perfil de expressão *in vivo*. Os perfis de expressão *in silico* e *in vivo* não foram similares para nenhum dos genes.

Palavras-chave: Estresse abiótico. Palma de óleo. RNA-seq. Transcritômica. OmicsBox.

Prospection and annotation of genes responsive to salinity stress in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), and characterization of gene expression profile using qPCR

ABSTRACT

Transcriptomics is the use of different techniques in the study of an organism's transcriptome. Among the most used techniques, RNA-seq is the one that stands out the most today. RNA-seq is the sequencing of cDNAs derived from transcripts, on a large scale, using NGS (Next Generation Sequencing) platforms. The analysis of RNA-seq data allows characterizing the profile of gene expression *in silico* in a given condition, such as saline stress. It is done using strategies of differential gene expression analysis. The profile determined *in silico* needs to be validated *in vivo*, which can be done using the RT-qPCR technique. This work aimed to prospect *E. guineensis* genes responsive to salinity stress, based on RNA-seq data obtained in a previous study. The genes prospected were then functionally and structurally annotated, before submitted to qPCR analysis. Leaves of palm oil plants - collected at five and 12 days after the onset of stress at 2.0 g of NaCl / 100 g of substrate - were subjected to total RNA extraction (three plants per treatment). The same was done with leaves from plants submitted to 0.0 g of NaCl / 100 g of substrate. The bioinformatics platform OmicsBox, version 1.2.4., Module “transcriptomics”, using the “Reference Based Transcriptomics Workflow” with adjustments, was used in the selection of genes responsive to salt stress; and to generate the expression profile *in silico* selected genes. 33 differentially expressed genes were identified when comparing samples with five days of stress and control; and 10 differentially expressed genes when comparing samples with 12 days of stress and control. The criteria used for selection were: up regulated when stressed, $FDR \leq 0.01$ and $\log FC \geq 5$. Six genes were common to both groups; and, based on their expression profiles *in silico*, three of these genes were chosen to generate the expression profile *in vivo*. The *in vivo* profile of these genes did not match their *in silico* profile.

Keywords: Abiotic Stress. Oil Palm. RNA-seq. Transcriptomics. OmicsBox.

1 INTRODUÇÃO

Transcritômica é um conjunto de técnicas utilizadas para estudar o transcrito de um organismo, cabendo destacar as técnicas de microarranjo e de RNA-seq. Transcritoma é a soma de todos os transcritos de uma célula, um tecido, um órgão, ou do organismo inteiro, em um determinado momento do desenvolvimento deste, em determinadas condições ambientais. Nos últimos anos, em decorrência dos avanços tecnológicos alcançados com a técnica de RNA-seq, e da significativa redução dos custos para aplicação dessa técnica, testemunhamos uma explosão na quantidade de dados de transcrito gerados e tornados públicos (LOWE *et al.*, 2017).

RNA-seq se refere ao sequenciamento em larga escala de cDNAs derivados de transcritos, mediante emprego de tecnologias de sequenciamento de nova geração, sendo que a abundância desses é derivada do número de sequências (“reads”) para cada transcrito (LOWE *et al.*, 2017). A análise dos dados de RNA-seq se inicia com uma análise da qualidade das sequências geradas, seguida por uma etapa de pré-processamento que visa melhorar a qualidade destas, e continua com o mapeamento de sequências de alta qualidade em um genoma ou transcrito de referência. Por fim, os dados mapeados são normalizados e utilizados para análise de expressão diferencial de genes, mediante emprego de métodos estatísticos e de aprendizado de máquina (“*machine learning*”) (COSTA-SILVA; DOMINGUES; LOPES, 2017; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

A análise de expressão diferencial é provavelmente a mais importante etapa que permite ao usuário interpretar as informações biológicas sobre os perfis de expressão de uma célula, um tecido, um órgão, ou do organismo inteiro, em um determinado momento do desenvolvimento deste, em determinadas condições ambientais distintas (JIMÉNEZ-JACINTO; SANCHEZ-FLORES; VEGA-ALVARADO, 2019). O perfil de expressão gênica *in silico* obtido com a análise de expressão diferencial contém as informações sobre genes relacionados à resposta do organismo a uma determinada condição como, por exemplo, estresse salino.

O perfil de expressão gênica obtido mediante análise de expressão diferencial precisa ser validado *in vivo*, o que pode ser feito utilizando a técnica de RT-qPCR. A transcrição reversa (RT) seguida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) representa uma ferramenta poderosa para a detecção e quantificação de mRNA. Esta técnica é considerada a mais sensível e eficaz para a detecção e quantificação da expressão de um gene (PFAFFL, 2004)

Vieira (2019) aplicou a fenômica, a transcritômica e a metabolômica para caracterizar as respostas morfofisiológicas, de expressão de transcritos e de metabólitos de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) a estresse salino. Este presente estudo objetivou prospectar genes de *E. guineensis* responsivos a estresse de salinidade, mediante análise dos dados brutos de RNA-seq, gerados por Vieira (2019). Os genes prospectados provenientes do sequenciamento foram submetidos à anotação estrutural e funcional, e os perfis de expressão gênica *in silico* e *in vivo* foram comparados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados brutos de RNA-Seq utilizados neste estudo para prospecção de genes de dendê (*E. guineensis*) responsivos a estresse de salinidade são oriundos do estudo realizado por Vieira (2019). Plantas de dendê foram submetidas a estresse de salinidade (2.0 g de NaCl / 100 g de substrato), e amostras de RNA total de folhas de três plantas (replicatas) com 5 e três com 12 dias de estresse foram coletadas, juntamente com amostras de RNA total de folhas de três plantas controle (0.0 g de NaCl / 100 g de substrato), e submetidas a sequenciamento em Plataforma Illumina - HiSeq3000 (Tabela 2).

2.1 Análise de expressão diferencial *in silico* e prospecção de genes responsivos à salinidade

Para a análise da expressão diferencial visando à prospecção de genes responsivos à salinidade em dendê, foi utilizada a plataforma de bioinformática OmicsBox (OmicsBox – Bioinformatics Made Easy, BioBam Bioinformatics, March 3, 2019, <https://www.biobam.com/omicsbox>), na sua versão 1.2.4., módulo “transcritomics”, utilizando o “Reference Based Transcriptomics Workflow” ajustado.

Tabela 1 - Amostras provenientes do sequenciamento pair-end (controle, estressadas com 5 e 12 dias)

Nome da Amostra	Tipo de Sequenciamento	Arquivos FastQ Utilizados
Control_R1	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2
Control_R2	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2
Control_R3	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2
05DaysStressed_R1	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2
05DaysStressed_R2	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2
05DaysStressed_R3	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2
12DaysStressed_R1	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2
12DaysStressed_R2	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2
12DaysStressed_R3	2X150bp Pair-end Sequencing	_1, _2

Fonte: Da autora (2020).

2.1.1 Reference Based Transcriptomics Workflow - Pré-processamento FASTQ, Verificação de qualidade FASTQ, Alinhamento de RNA-Seq e Geração de Tabela de Contagem (BAM + GFF)

Os 18 arquivos FASTQ das nove amostras sequenciadas foram submetidos ao pré-processamento utilizando os seguintes parâmetros: Remove Adapters: true; Use Adapters From: Default Adapter Sequences; Adapter Sequences: TruSeq3; Seed Mismatches: 2; Palindrome Clip Threshold: 30; Simple Clip Threshold: 15; Minimum Adapter Length: 8; Keep Both Reads: true; Trimming: true; Trimming Option: Sliding Window Trimming; Window Size: 4; Required Quality: 15; Filter By Quality: true; Average Quality: 25; Filter By Length: true; e Minimum Length: 36.

Após a triagem, os arquivos foram submetidos à análise de qualidade utilizando os seguintes parâmetros: Chart Read Length Binning: true; Provide Adapter Sequences: false; e Provide Contaminant Sequences: false.

Por fim, os arquivos com as sequências de alta qualidade foram submetidos ao mapeamento contra o genoma completo de *Elaeis guineensis* - EG5 - BioProject PRJNA192219 (www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/192219), utilizando o arquivo EG5_genomic_Version3_AnnotRelease102.gff3 disponível em ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Elaeis_guineensis/GFF/, utilizando os seguintes parâmetros: Sequencing Data: Paired-End Reads; Overhang: 100; Upstream Files Pattern: _1; Downstream Files Pattern: _2; 2-pass Mapping: true; Sort by Coordinate: true; Min. Intron Length: 20; Max. Intron Length: 1000000; Max. Distance Between Mates: 1000000; Include Chimeric Alignments: false; Max. # of Multiple Alignments: 20; Max. # of Mismatches: 999; Save Splice Junctions: false; e Save Unmapped Reads: false.

Os nove arquivos BAM gerados durante a etapa de mapeamento foram submetidos à geração da Count Table (BAM + GFF) utilizando os seguintes parâmetros: Quantification Level: gene; Name/Group By: ID; Strand Specificity: Non Strand Specific; Overlap Mode: Union; e Minimum Mapping Quality: 10.

2.1.2 Reference Based Transcriptomics Workflow - Análise da expressão diferencial

Para a seleção dos genes diferencialmente expressos aos 12 e 5 dias após o início do estresse salino, em comparação à planta não estressada, foram utilizados os seguintes parâmetros: CPM Filter: 1.0; Samples reaching CPM Filter: 3; Normalization Method: TMM (Trimmed mean of M values); Design Type: Simple Design; Primary Experimental Factor:

Time; Primary Contrast Condition: 5 ou 12 dias; Primary Reference Condition: 0; Select a Statistical Test: Exact Test; e Robust: true.

2.2 Seleção e anotação estrutural e funcional de genes responsivos à salinidade

Para selecionar os genes responsivos à salinidade, foram utilizados os seguintes critérios: $FDR \leq 0.01$, $\log FC \geq 5$, e $\log CPM = 1$. Estes critérios foram utilizados para selecionar genes diferencialmente expressos entre as plantas controle e as estressadas, tanto aos 5 dias quanto aos 12 dias de estresse. Os genes selecionados como *up regulated* entre o controle e doze dias de estresse foram submetidos à anotação estrutural e funcional, tendo como base o genoma de dendê disponível no NCBI (SINGH *et al.*, 2013).

2.3 Análise do perfil de expressão diferencial *in vivo* dos genes responsivos à salinidade

Três dos genes responsivos ao estresse salino selecionados e anotados foram submetidos à análise do perfil de expressão *in vivo* utilizando a técnica de qPCR. Inicialmente, as sequências dos três genes alvo foram obtidas do Genbank e exportadas para o programa primer3plus (bioinformatic). Foram escolhidos dois pares de *primers* para cada gene alvo.

Durante o experimento realizado com dendê (*Elais guineensis*) para analisar a resposta da planta para com o estresse salino no substrato, foram selecionadas 3 plantas para coleta de material para análise. O material (folhas) foi armazenado em um freezer -80°C . As coletas consistiram em: plantas controle, plantas estressadas coletadas aos 5 dias após o início do estresse, e 12 dias após o início do estresse salino.

As amostras dos tecidos das folhas de dendê (*Elais guineensis*) foram inicialmente fragmentadas em grau com pistilo contendo nitrogênio líquido. A seguir foram misturadas ao reagente Trizol (Invitrogen) com auxílio de um homogenizador de tecidos (MA102, Marconi). A extração de RNA foi realizada seguindo as instruções do fabricante. O RNA extraído para o teste descrito a seguir continha 400 ng / ul.

As amostras de RNA foram tratadas com Dnase (Deoxyribonuclease I, Invitrogen) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, e todo o processo foi realizado de acordo com o kit da invitrogen. A seguir foi feito o cDNA para um volume total de 100ul e, em seguida, a técnica de PCR convencional foi realizada com os pares de *primers* para que fosse possível ser escolhido o melhor par de *primer* para cada um dos genes. Para isso, foi

utilizado o material vegetal estressado de 5 dias. O procedimento seguiu de acordo com o kit da invitrogen.

Foi realizada uma q-PCR para análise quantitativa visual dos 8 genes responsivos ao estresse salino encontrados anteriormente. Para a realização da PCR quantitativa em tempo real (qPCR), utilizou-se o kit comercial SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal (Invitrogen®) (INVITROGEN, 2010). O protocolo foi modificado em relação ao volume da reação. O cDNA obtido anteriormente foi diluído serialmente 1:100. Os componentes presentes no kit comercial foram adicionados a placas de qPCR de 96 poços do tipo universal. Todos os genes foram comparados com o gene de referência.

As leituras da fluorescência foram realizadas pelo StepOnePlus™ Real-Time PCR a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisadas pelo software StepOne™/StepOnePlus™Software v2. 3 - Life Technologies. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições, e o resultado, expresso em valor de Ct, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Os resultados individuais expressos em valores de Ct foram analisados pelo próprio software (VARGAS, 2014).

3 RESULTADOS

Três objetivos específicos principais orientaram a realização deste capítulo. O primeiro visou prospectar no genoma de palma de óleo (*Elaeis guineensis*) genes responsivos ao estresse salino; o segundo visou realizar a anotação estrutural e funcional dos genes prospectados; e, por fim, caracterizar, mediante emprego da técnica de qPCR, o perfil de expressão dos genes responsivos a estresse salino selecionados.

3.1 Pré-processamento FASTQ, Verificação de qualidade FASTQ, Alinhamento de RNA-Seq e Geração de Tabela de Contagem (BAM + GFF)

A Tabela 2 mostra que após o pré-processamento foi gerado um conjunto de sequências de alta qualidade que não apresentam leituras de baixa qualidade, o percentual do número das leituras foi de 23%, o tamanho das sequências segue um padrão de no máximo 150 pb e o percentual de GC foi de 50%.

Após a análise de qualidade foi feito o mapeamento, que remete ao processo de alinhamento das sequências das amostras contra o genoma de referência de dendê. O percentual das leituras únicas mapeadas foi de 92% (Tabela 3).

Após o mapeamento foi realizada uma tabela de contagem que estima a expressão gênica de experimentos de sequenciamento de RNA. Essa ferramenta utiliza arquivos com leituras de sequenciamento alinhadas no formato SAM / BAM e um arquivo GTF / GFF com coordenadas de características genômicas. Ele faz a contagem de quantas leituras são mapeadas para cada recurso de interesse (genes, exon). É obtida uma tabela de contagem que pode ser usada para executar uma análise de expressão diferencial dentro do OmicsBox, que está evidenciada na Tabela 4.

Na Figura 18, é evidenciada a análise de como as contagens são distribuídas em cada amostra para todos os recursos (gene, exon).

A Figura 19 mostra as mesmas informações da tabela anterior (Tabela 4) em formato de imagem e em porcentagem. Para cada amostra foram atribuídas contagens relativas.

Tabela 2 - Análise de qualidade das sequências das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse)

Nome da Amostra	Número de Leituras	Leituras de Baixa Qualidade	Comprimento da Sequência	GC%
Control_R1_1	29.858.321	0	36-150	50.0
Control_R1_2	29.858.321	0	36-150	50.0
Control_R2_1	30.782.147	0	36-150	50.0
Control_R2_2	30.782.147	0	36-150	50.0
Control_R3_1	20.592.830	0	36-150	50.0
Control_R3_2	20.592.830	0	36-150	50.0
05DaysStressed_R1_1	22.654.938	0	36-150	51.0
05DaysStressed_R1_2	22.654.938	0	36-150	51.0
05DaysStressed_R2_1	22.165.930	0	36-150	50.0
05DaysStressed_R2_2	22.165.930	0	36-150	50.0
05DaysStressed_R3_1	21.590.646	0	36-150	51.0
05DaysStressed_R3_2	21.590.646	0	36-150	51.0
12DaysStressed_R1_1	20.341.988	0	36-150	50.0
12DaysStressed_R1_2	20.341.988	0	36-150	50.0
12DaysStressed_R2_1	21.468.502	0	36-150	51.0
12DaysStressed_R2_2	21.468.502	0	36-150	51.0
12DaysStressed_R3_1	22.785.976	0	36-150	49.0
12DaysStressed_R3_2	22.785.976	0	36-150	49.0

Legenda: Quantidade de leituras totais, Quantidade de leituras de qualidade baixa, Tamanho das sequências e Percentual das bases nitrogenadas (GC).

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 3 - Mapeamento das sequências de alta qualidade das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse) contra o genoma de referência de *Elaeis guineensis* (EG5) anotado e disponível no NCBI

Nome da Amostra	Leituras Mapeadas Exclusivamente	Comprimento Médio Mapeado	Número de Splices					
			Total	Anotado	GT/AG	GC/AG	AT/AC	Não canônicos
Control_R1	27.951.593 / 93.614%	290.41	25.948.276	25.886.259	25.304.981	487.59	20.512	135.193
Control_R2	28.919.398 / 93.949%	290.6	26.607.606	26.543.086	25.967.802	489.874	21.964	127.966
Control_R3	18.077.169 / 87.784%	291.76	16.360.995	16.325.627	15.973.403	297.719	12.137	77.736
05DaysStressed_R1	19.807.753 / 87.432%	291.67	16.776.326	16.736.681	16.389.272	289.214	14.179	83.661
05DaysStressed_R2	20.306.495 / 91.611%	292.37	18.836.359	18.798.940	18.436.874	299.904	16.229	83.352
05DaysStressed_R3	19.011.515 / 88.054%	292.34	15.931.520	15.897.666	15.578.571	259.809	13.575	79.565
12DaysStressed_R1	17.985.617 / 88.416%	291.87	15.668.872	15.628.953	15.311.987	260.646	13.966	82.273
12DaysStressed_R2	18.350.992 / 85.479%	292.11	15.077.028	15.040.772	14.735.012	245.92	13.647	82.449
12DaysStressed_R3	20.766.103 / 91.135%	292.24	18.440.136	18.396.041	18.019.254	315.964	14.609	90.309

Legenda: Leituras únicas mapeadas das amostras, Comprimento médio mapeado, Total de sequências, Quantidade de sequências anotadas no genoma, Quantidade de splices dos pares de base (GT/AG. GC/AG. AT/AC), e Quantidade de não canônicos.

Fonte: Da autora (2020).

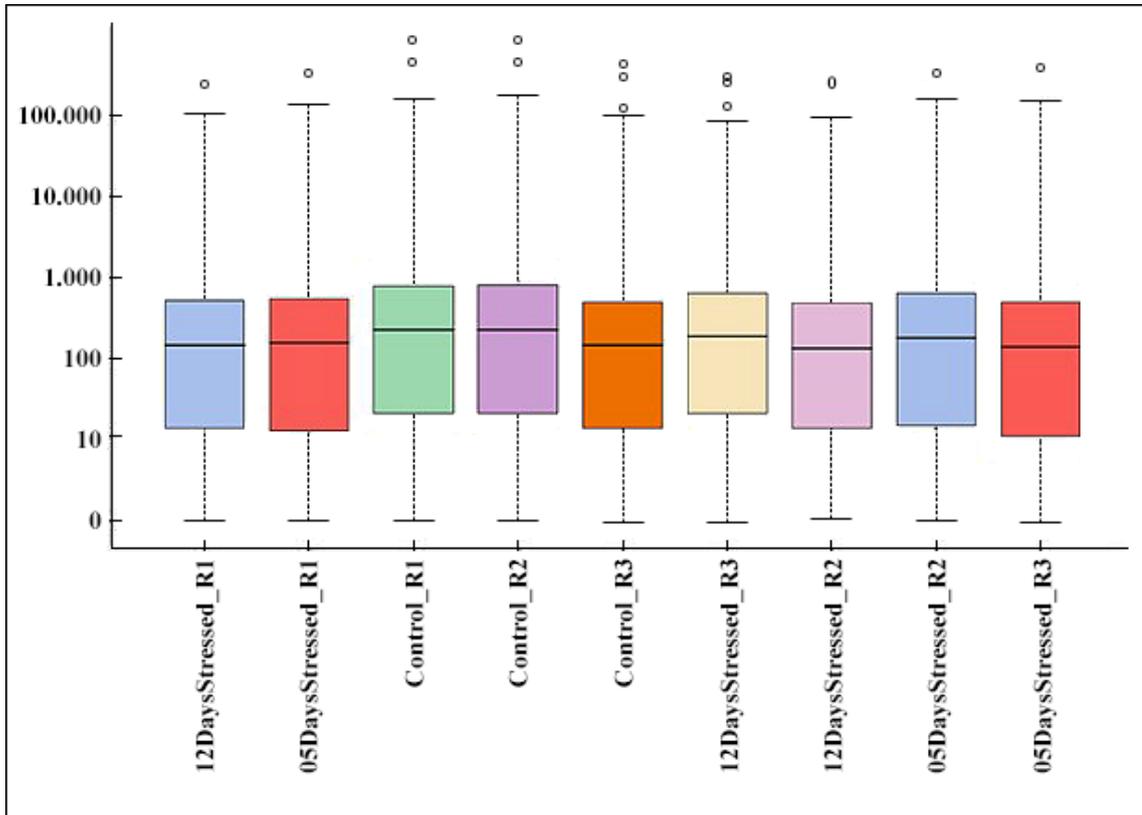
Tabela 4 - Quantificação das sequências de alta qualidade das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse) contra o genoma de referência de *Elaeis guineensis* (EG5) anotado e disponível no NCBI

Leituras de Entrada		Leituras Alinhadas					
Nome da Amostra	Total de "Pair End Sequences"	A Genes	Não Genes	Ambíguas	Alinhamentos não únicos	Alinhamento de Baixa Qualidade	Não Alinhados
Control_R1	29.692.333	25.692.842 / 86.53%	1.799.259 / 6.06%	458.227 / 1.54%	1.740.740 / 5.86%	0	1.265 / 0.00%
Control_R2	30.515.836	26.675.395 / 87.41%	1.771.330 / 5.80%	471.103 / 1.54%	1.596.438 / 5.23%	0	1.570 / 0.01%
Control_R3	22.045.218	15.956.976 / 72.38%	1.849.181 / 8.39%	270.187 / 1.23%	3.968.049 / 18.00%	0	825 / 0.00%
05DaysStressed_R1	24.580.201	16.132.336 / 65.63%	3.417.878 / 13.91%	256.196 / 1.04%	4.772.448 / 19.42%	0	1.343 / 0.01%
05DaysStressed_R2	23.155.078	17.626.321 / 76.12%	2.419.865 / 10.45%	259.472 / 1.12%	2.848.583 / 12.30%	0	837 / 0.00%
05DaysStressed_R3	23.419.547	15.219.468 / 64.99%	3.561.579 / 15.21%	229.205 / 0.98%	4.408.032 / 18.82%	0	1.263 / 0.01%
12DaysStressed_R1	21.622.164	15.579.276 / 72.05%	2.188.717 / 10.12%	216.528 / 1.00%	3.636.547 / 16.82%	0	1.096 / 0.01%
12DaysStressed_R2	23.732.714	14.771.292 / 62.24%	3.367.254 / 14.19%	211.131 / 0.89%	5.381.722 / 22.68%	0	1.315 / 0.01%
12DaysStressed_R3	23.608.152	18.499.033 / 78.36%	2.027.638 / 8.59%	238.601 / 1.01%	2.842.049 / 12.04%	0	831 / 0.00%

Legenda: Recurso: soma de todas as leituras que foram atribuídas a qualquer gene; Sem recurso: leituras que não puderam ser atribuídas a nenhum gene; Ambíguo: lê as sequências que foram atribuídas a mais de um recurso. Essas leituras não são contadas para nenhum recurso; Alinhamento não exclusivo: lê com mais de um alinhamento relatado; Baixa qualidade de alinhamento: leituras ignoradas devido ao filtro "Qualidade mínima de mapeamento". Não alinhado: lê o arquivo SAM / BAM sem alinhamento.

Fonte: Da autora (2020).

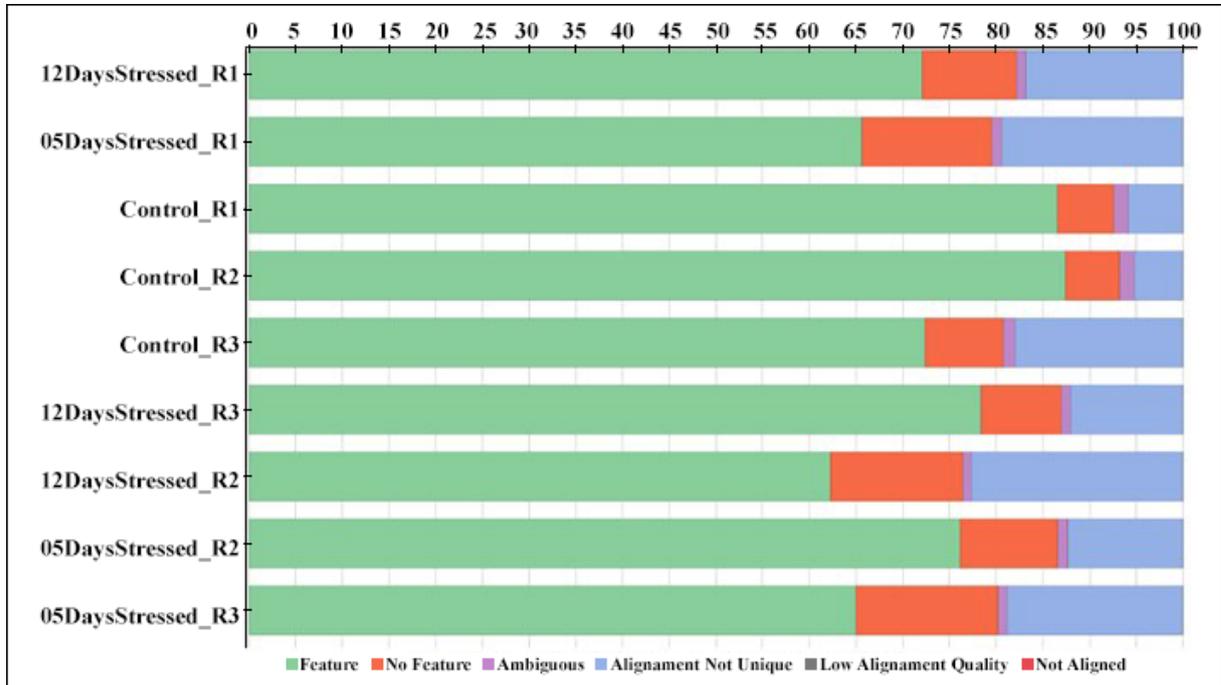
Figura 18 - Distribuição dos grupos de contagem



Legenda: Diagrama de caixa que permite ver como as contagens são distribuídas em cada amostra para todos os recursos. Recursos com contagem de zero em todas as amostras foram descartados para este diagrama.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 19 - Quantificação das sequências de alta qualidade das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse) contra o genoma de referência de *Elaeis guineensis* (EG5) anotado e disponível no NCBI em porcentagem



Legenda: Recurso: a soma de todas as leituras que foram atribuídas a qualquer gene; Sem recurso: leituras que não puderam ser atribuídas a nenhum gene; Ambíguo: lê as sequências que foram atribuídas a mais de um recurso. Essas leituras não são contadas para nenhum recurso; Alinhamento não exclusivo: lê com mais de um alinhamento relatado; Baixa qualidade de alinhamento: leituras ignoradas devido ao filtro "Qualidade mínima de mapeamento". Não alinhado: lê o arquivo SAM / BAM sem alinhamento.

Fonte: Da autora (2020).

3.2 Análise da expressão diferencial, seleção e anotação de genes responsivos a estresse salino

Para analisar a diferença entre os grupos comparados (Controle x Estressado 5 dias e Controle x Estressado 12 dias) foi gerada uma escala multidimensional na qual as distâncias representam as alterações típicas de logFC entre as amostras (Figura 20).

A figura 21 apresenta um gráfico de dispersão construído plotando o log negativo dos valores ajustados (FDR) no eixo y versus o logFC no eixo x; sendo que foram selecionados somente aqueles genes com $FDR \leq 0.01$ e $\logFC \geq 5$. Os genes *up-regulated* selecionados são mostrados em vermelho e os *down-regulated* são mostrados em verde (Figura 21).

Já a figura 22 apresenta um gráfico de dispersão construído plotando logFC alterado no eixo y versus a média do log do CPM no eixo x; sendo que são apresentados em vermelho somente aqueles genes com $FDR \leq 0.01$.

O HeatMap é uma representação visual bidimensional de dados na qual valores numéricos de pontos são representados por uma gama de cores (Figura 23). Os dendrogramas adicionados ao lado esquerdo e superior são produzidos por um método hierárquico de agrupamento que toma como entrada a distância euclidiana calculada entre genes (à direita) e amostras (embaixo). As primeiras barras contém o desenho experimental dos dados mostrando a associação entre amostras e amostras experimentais covariáveis. Foram encontrados 33 genes diferencialmente expressos ($FDR \leq 0.01$ e $\log FC \geq 5$) quando comparadas as amostras controle com amostras estressadas por 5 dias; e 10 genes quando comparadas as amostras controle com amostras estressadas por 12 dias.

Figura 20 - MDS-Plot: Escala multidimensional relativa à separação do grupo controle e do grupo estressado com diferentes concentrações de NaCl coletados com 5 e com 12 dias

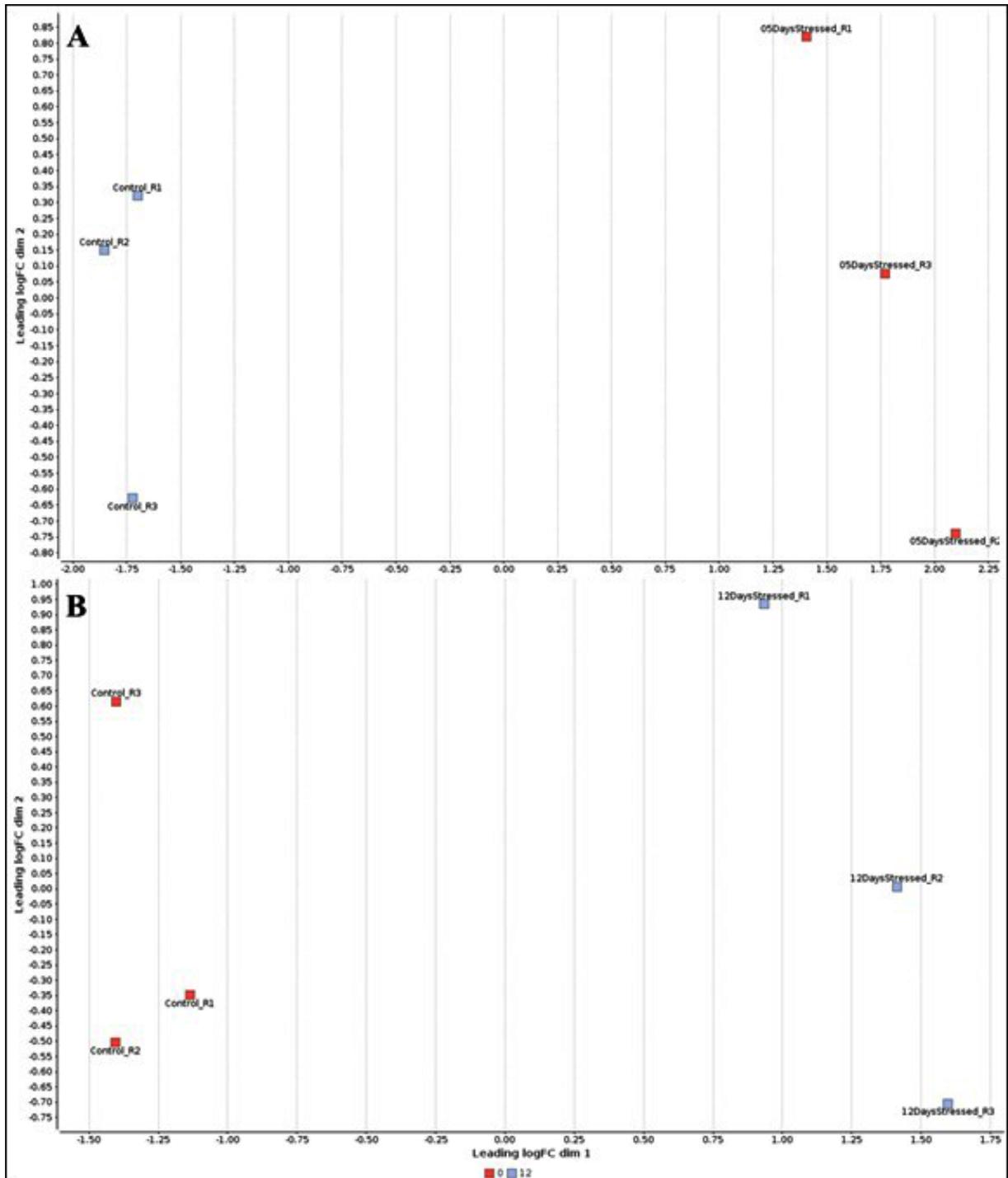
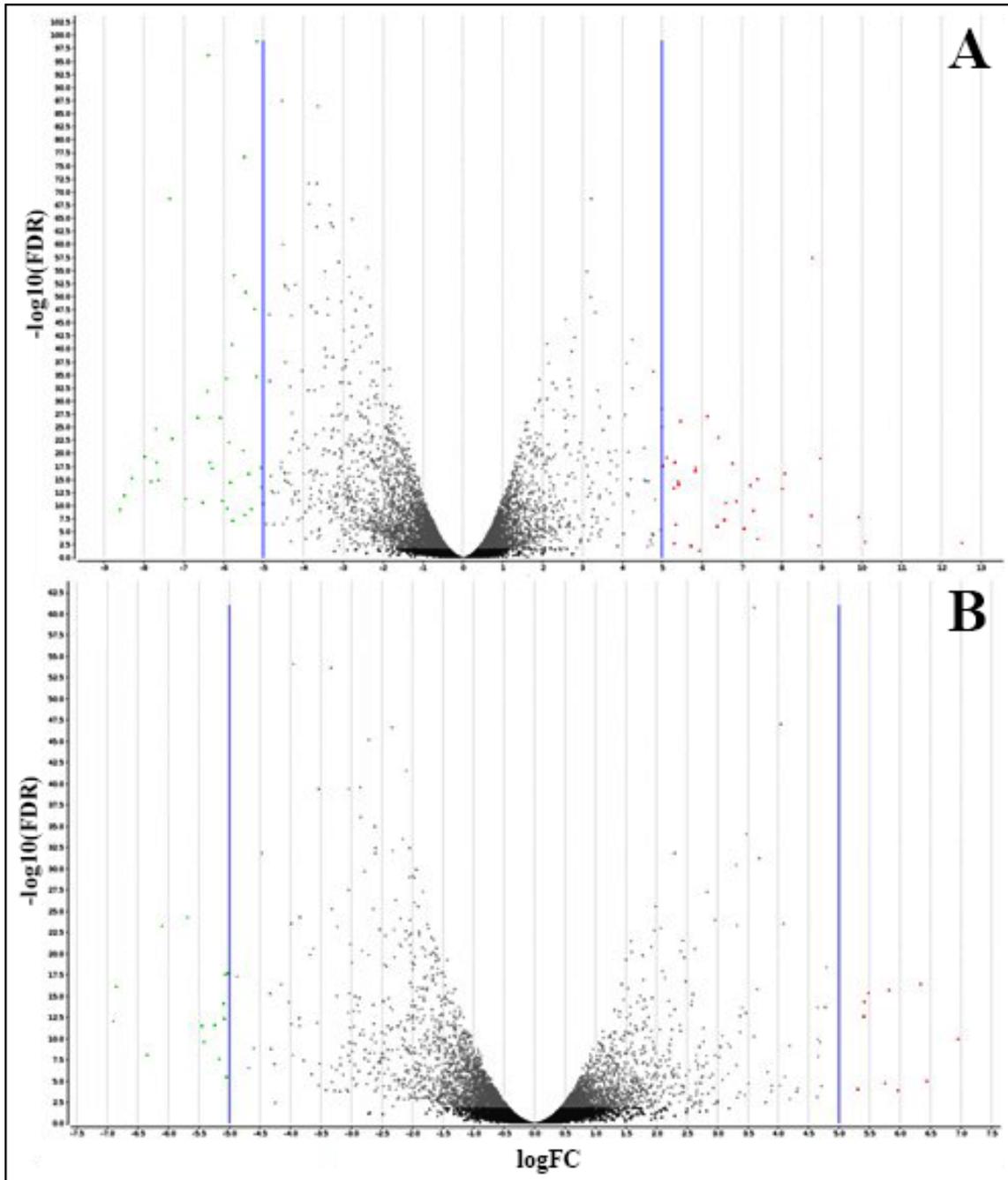


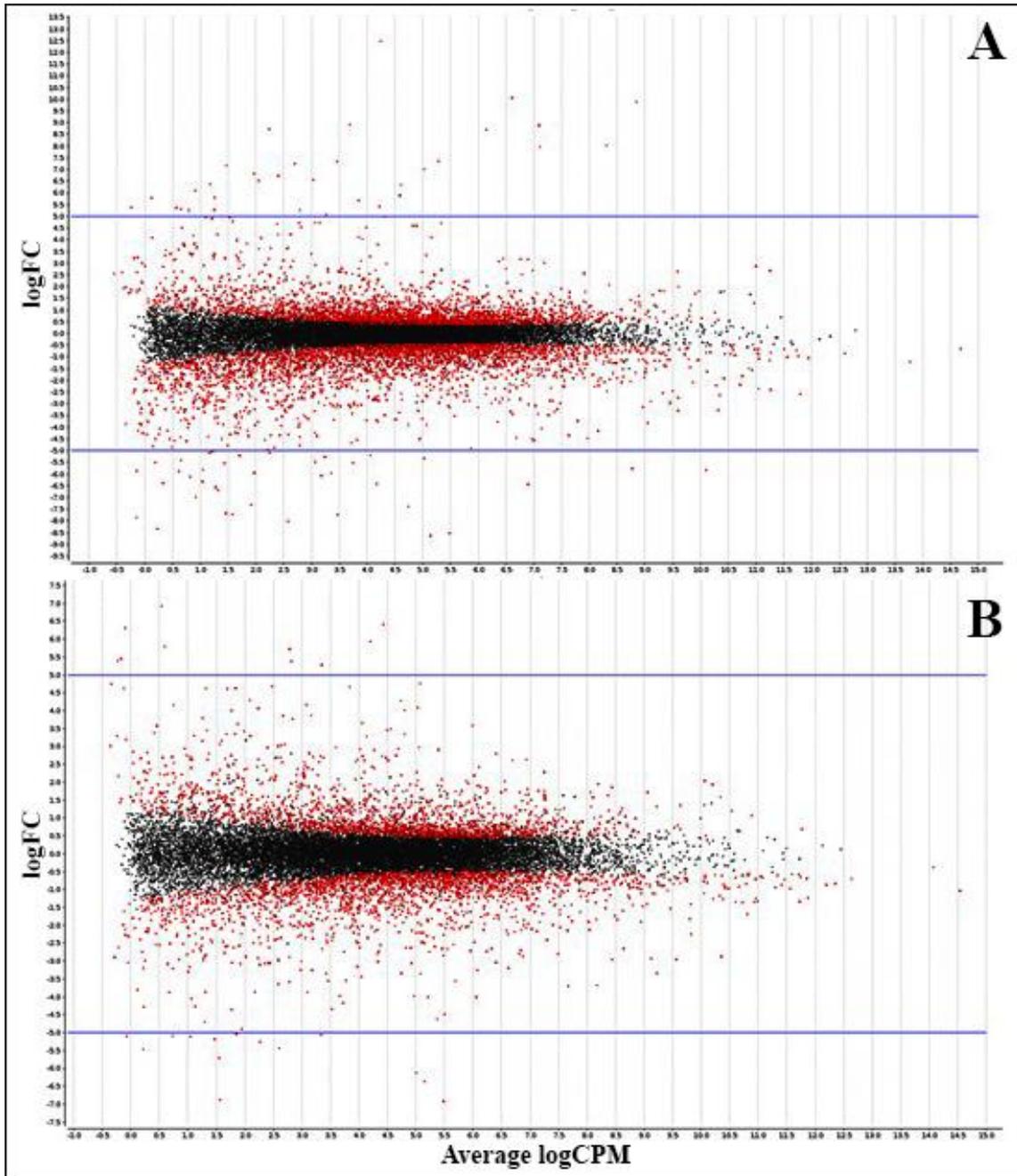
Figura 21 - Volcano-Plot: Gráfico de dispersão relativo aos genes *up-regulated* e *down-regulated* estressados aos 5 e aos 12 dias



Legenda: (A) Representação dos genes *up-regulated* (5 dias) em vermelho com $\text{FDR} \leq 0,01$ e $\log_{\text{FC}} \geq 5,0$; genes *down-regulated* estão representados em verde com $\text{FDR} \leq 0,01$ e $\log_{\text{FC}} \leq 5,0$; os genes representados na cor cinza possuem $\text{FDR} \leq 0,01$; e os genes representados na cor preta possuem $\text{FDR} \geq 0,01$. (B) Representação dos genes *up-regulated* (12 dias) em vermelho com $\text{FDR} \leq 0,01$ e $\log_{\text{FC}} \geq 5,0$; genes *down-regulated* estão representados em verde com $\text{FDR} \leq 0,01$ e $\log_{\text{FC}} \leq 5,0$; os genes representados na cor cinza possuem $\text{FDR} \leq 0,01$; e os genes representados na cor preta possuem $\text{FDR} \geq 0,01$.

Fonte: Da autora (2020).

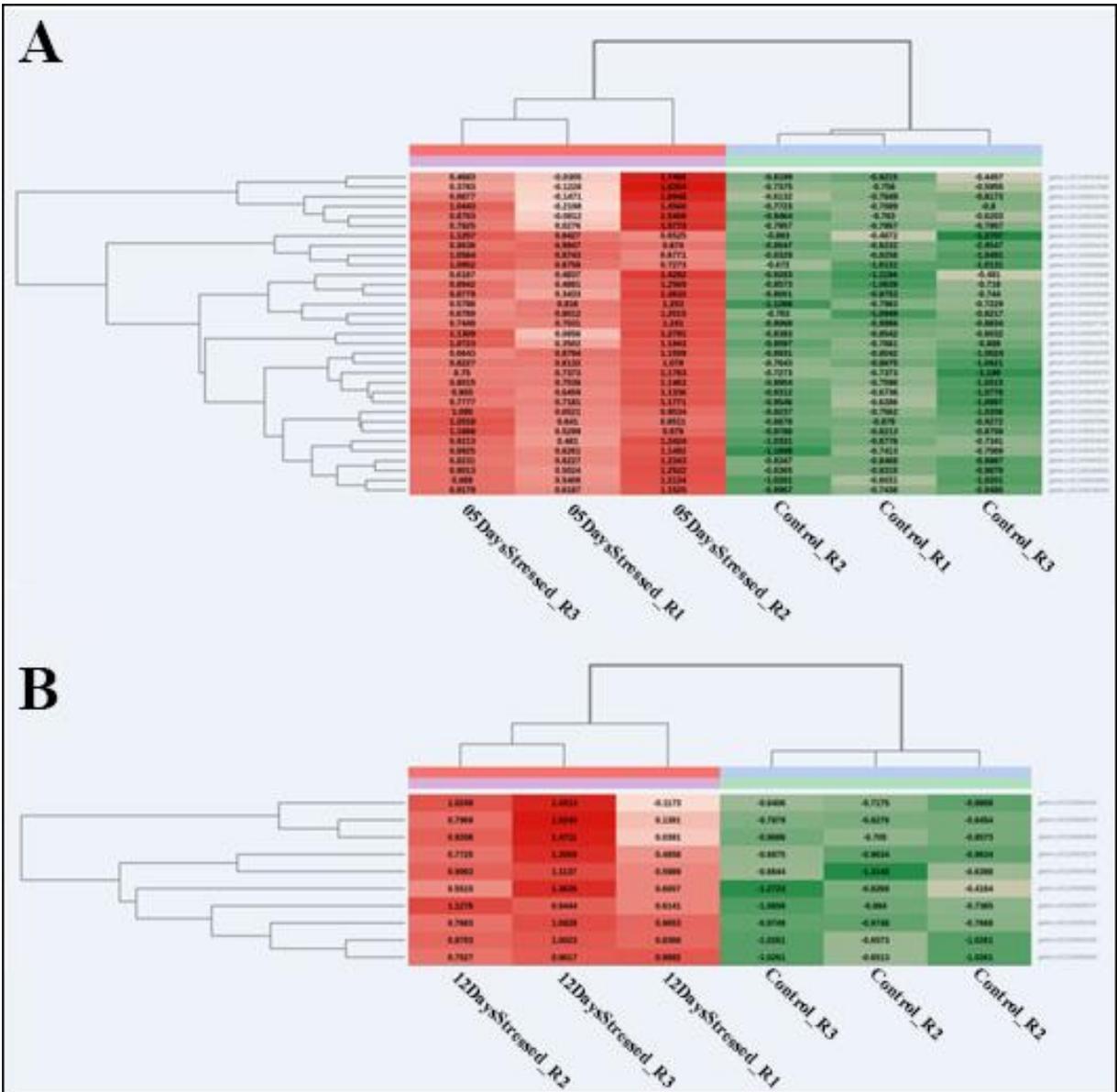
Figura 22 - MA-Plot: Gráfico relativo à representação dos genes *up-regulated* referente ao estresse de 5 e 12 dias



Legenda: (A) Representação dos genes *up-regulated* (5 dias) em vermelho com $FDR \leq 0,01$ e $\log FC \geq 5,0$; e os genes representados na cor preta possuem $FDR \geq 0,01$. (B) Representação dos genes *up-regulated* (12 dias) em vermelho com $FDR \leq 0,01$ e $\log FC \geq 5,0$; e os genes representados na cor preta possuem $FDR \geq 0,01$.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 23 - Mapa de calor da associação entre amostras de folha de dendê controle e amostras de folha de dendê estressadas com 5 e com 12 dias



Legenda: (A) Associação entre amostras de folha de dendê controle e amostras de folha de dendê estressadas com cinco dias. (B) Associação entre amostras de folha de dendê controle e amostras de folha de dendê estressadas com 12 dias.

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 5 - Dados estatísticos gerados a partir da análise de expressão diferencial utilizando o software *edgeR* (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) para os genes *up-regulated* selecionados, mediante uso dos critérios $FDR \leq 0.01$ e $\logFC \geq 5$, e que estavam presentes quando comparando as plantas controle vs. estressadas por cinco dias, e também quando comparando as plantas controle vs. estressadas por 12 dias

Símbolo do gene	FC	logFC	logCPM	P-Value	FDR
LOC105055832	61.78245385346276	5.94912526743785	4.19742382282159	9.86609252933471E-6	1.11762671824238E-4
LOC105055156	80.01363947475419	6.32217404395396	-0.108356975711198	2.10408072102021E-19	3.27046579612346E-17
LOC105045973	86.1173894404394	6.42823268124787	4.42082753645471	5.3837755475566E-7	8.80108066450999E-6
LOC105047536	42.01546149952851	5.39284842572865	2.80734979266622	2.62754706138134E-15	2.27516780479335E-13
LOC105058460	42.2957408136076	5.40244048597579	-0.23774609039843	3.6478576100151E-17	4.14217508136026E-15
LOC105039727	56.03242147207154	5.80818993566647	0.58521585717272	1.23427499253139E-18	1.7337449395091E-16

Legenda: FC: Razão entre o valor médio da abundância de um Teste de Abundância Diferencial específica na condição de contraste e na condição de referência, se o valor médio da abundância no grupo de contraste for maior que no grupo de referência. Se esse valor for maior no grupo de referência, o FC será calculado como a razão entre o valor médio da abundância na condição de referência e o valor em a condição de contraste com um sinal negativo. logFC: medida que descreve o quanto a expressão muda entre as condições, logCPM: a média log₂-count-per-million, p-Value: Valor p para a hipótese nula de abundância não diferencial, FDR: Um valor p corrigido para múltiplas comparações de testes (BENJAMINI, Y.; HOCHBERG Y., 1995), se atendendo ao critério logFC (logFC > 1 ou logFC < -1 por padrão).

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 6 - Anotação estrutural e funcional dos genes *up-regulated* selecionados, mediante uso dos critérios $FDR \leq 0.01$ e $\log FC \geq 5$, e que estavam presentes quando comparando as plantas controle vs. estressadas por cinco dias, e também quando comparando as plantas

Símbolo do Gene	Descrição do gene	Cromossomo / Scaffold	# de exons	Tipo do gene	Sentido
LOC105055832	Probable vacuolar amino acid transporter YPQ1	13	12	Codificação de proteínas	Anti-sense
LOC105055156	Thiosulfate sulfurtransferase 16. chloroplastic	12	7	Codificação de proteínas	Anti-sense
LOC105045973	Non-specific lipid-transfer protein 1	5	2	Codificação de proteínas	Anti-sense
LOC105047536	Acidic endochitinase	6	1	Codificação de proteínas	Sense
LOC105058460	Transcription factor bHLH94	15	3	Codificação de proteínas	Anti-sentido
LOC105039727	Glycine-rich cell wall structural protein 2	2	1	Codificação de proteínas	Anti-sentido

Legenda: Símbolo dos genes selecionados, Descrição dos mesmos, Posicionamento no cromossomo, Quantidade de exons, Tipo de gene, e o sentido da fita complementar de DNA.

Fonte: Da autora (2020).

3.3 Análise do perfil de expressão *in vivo* dos genes responsivos a estresse salino

De acordo com as análises utilizando a plataforma de bioinformática OmicsBox (OmicsBox – Bioinformatics Made Easy, BioBam Bioinformatics, March 3, 2019, <https://www.biobam.com/omicsbox>), na sua versão 1.2.4., módulo “transcriptomics”, utilizando o “Reference Based Transcriptomics Workflow” ajustado, onde foi comparado o perfil de expressão diferencial entre 0 e 5 dias vs 0 e 12 dias. Foram encontrados 33 genes diferencialmente expressos ($FDR \leq 0.01$ e $\log FC \geq 5$) quando comparadas as amostras controle com amostras estressadas por 5 dias; e 10 genes quando comparadas as amostras controle com amostras estressadas por 12 dias (Figura 23).

Seis desses genes estavam superexpressos tanto em 5 dias, como em 12 dias. Com base nos padrões de expressão dos mesmos, foram escolhidos três genes para a devida comparação *in vivo* via qPCR, evidenciados na Quadro 2 a seguir. A figura 24 demonstra os perfis de expressão *in silico* e *in vivo* dos três genes selecionados para análise por qPCR.

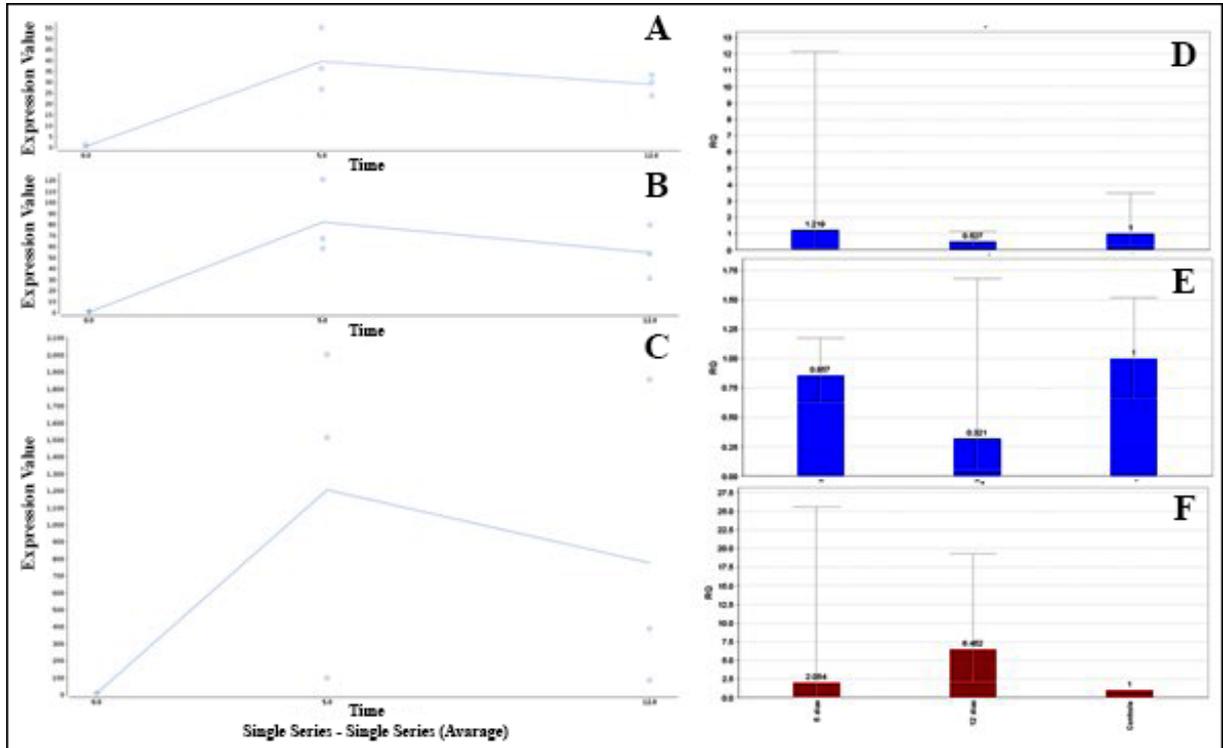
Quadro 2 - Sequências dos três genes selecionados para análise por qPCR, e dos respectivos pares de primers utilizados

Símbolo do gene	Sequência do gene	Par de Primers 1	Par de Primers 2
LOC105045973	ATGGCTCGTGCCTGCTCTCTGCCACGGTGGTGGTCTCGCCGTGCTGCTGGTGGCGGCACCGTACACGGCGCATGCCATCACCTGCGGCCAGGTGGTGTCTACCTGACCCATGCATCTCTACGCCCGCAGCGGTGGCAGGTCCCGCCGGGTGCTGCAGTGGAGTGAAGGGACTCGTCGCGCGCGGAGGACCACCGCTGACCGCCGGACGGCATGCACCTGCCTCAAGAACACCGCCGCTGTTTGTCCGGCTCAAGCCCGGCCTCATCTCCGGTATCCCCGGCAAGTGCCTGTCGCGTTCCTACGCCATCAGCCCTCCACCGACTGCTCTAGGGTGAGCTAA	L: GCAGTGGAGTGAAGGGACTC R: AGCTCACCTAGAGCAGTCG	L: TGACCCATGCATCTCTCTAC R: AGCTCACCTAGAGCAGTCG
LOC105039727	ATGGCTTGCCTGAACCCTCTTCTCCCTGCTATTCTTGTGCTGTTGCTTCTTTGCTTGGTAGCAGAATGTCGGGTCTCCAGGAAGGACCTTGGTGTGGGCTGGGTGGTGGACTTGGCGTTGGAGTTGGTGTGGCTTAGGAGGTGGTAGTGTCTCCGGTCCGGTCCGGTTCGGCTCTGGCTCTGGATCTGGTGCGGGGTCTGGGGCCGGTTCAGGTGCAGGGTATCCGCAGGGTCTGATGCCGGTTCAGGTTCCGGTTATGGTTCGGCCAAGGGTCTGGCTCCGGATCTGGTACGGGATATGGTGAAGGTACCGTGAAGGCCATGGCCATGGTGCGGAACTGGTTCGGGACATGGTGAAGGTACGGCGAAGGGTATGGTGAAGGCCATGGTCTGGTCTGGTGTATGGTTCAGGCTCGGGTATGGTGAAGGTACGGGTCTGGGTCTGGTATGGTAGCGCCATGGCAAGTGA	L: CTTGCGTGAACCCTCTTCTC R: AAGCCAACCAACTCCAAC	L: CTTGCGTGAACCCTCTTCTC R: ACCTCCTAAGCCAACACCA
LOC105058460	ATGGCTCTAGATGCTGCGGTCTTCCACAAGACCCTTTGGTTGCACCATGAAGGAGTTCTACACCTTGGGAGGAGTATGGAACATATGGTTTTGGTGGGTTGGAAGGGAAGGGGGTGGTGGTTGAATGCAAGATGGATGGTGGTGGTGGTGGGGTGAGGCAAGAGCAGGAAAGGGGGTGGTTGATGGAGTGCATGGGAACTGGGACTCCTCTTGTCTTCTTGGTGCAAAAACCTTGAGGAGTGGGATGTGAATTCCTCACCCCATCGGAGACTGGTGGCCGGGAGACGGCGATGAGGGGCCGGAGGAAGAGGCGACGCAACAAGAGTTCAAGAACAAGGAGGAGGTGGAGAACCAGAGGATGACCCACATTGCGGTGGAGCGCAACCGCGAAAGCAGATGAACGAGTACCTCTCATCGATCCGGTCCCTCATGCCTCCTTCTATGTGCAAAAGGGTGTATCAAGCATCAATAATTGGTGGCGCAATAAATTATGTCAAAGAGCTTGAGCAACTTCTCAATCTCTCGAAGTTCAAAAAGCGACTGAAGCAAAGATCCGATACAGTTTCTTTGCTGATTCTTACCTTCTCAGTACTCATCATGCTCTTCTCAAAGTGCAAACGGCGCTGCAACCACCACCACCGTGCAGCCGCATCAACACCAACGCTACTGAGATAATGGCTGAGAACCAGGTCGGCCATAGCCGACATTGAGGTAATGATGGTGCAGCCATGCCAATCTCAAGGTTCTCGAGACGGCAGCAAGCAGCTGCTCAAGTTAGTGGTGGGCTTACAGAACCTGCAGCTCACTACACTCCACCTCAATGTGACCACCATGGATGAAATGGTCTCTACTCATTAGTCTCAAGGTAGAAGATGATTGCCAATACACATCTGTGGATGAAATTGCTACTGCAGTCTATCAAATGGTTGGGAAGATTCAACAGTCGTCGGATCTTAACATA	L: GGTGACCATGAAGGAGTT R: CACCAAGGAAGAGCAAGAGG	L: ACCTTGAGGAGTGGGATGTG R: GACCGGATCGATGAGAGGTA

Legenda: As letras L e R significam esquerda e direita, respectivamente.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 24 - Perfis de expressão *in silico* e *in vivo* dos três genes selecionados para análise por qPCR



Legenda: Perfis de expressão de LOC105058460 (A e D), LOC105039727 (B e E) e LOC105045973 (C e F).

Fonte: Da autora (2020).

4 DISCUSSÃO

4.1 Análise de expressão diferencial, prospecção e anotação de genes responsivos à salinidade

A crescente pesquisa na área de expressão gênica em busca de genes candidatos associados às respostas aos estresses abióticos tem possibilitado estudar o transcrito e identificar genes responsivos a diversos estresses, tanto bióticos como abióticos (TORRES, 2017). O principal objetivo deste capítulo foi analisar o perfil de expressão de genes de *Elaeis guineensis* Jacq. responsivos a estresse de salinidade, observado mediante análise *in silico* de expressão diferencial e comparar seu comportamento *in vivo* mediante a técnica de qPCR.

De acordo com o “Reference Based Transcriptomics Workflow” utilizado, os dados obtidos após a realização do Pré-processamento FASTQ, verificação de qualidade FASTQ, alinhamento de RNA-Seq e geração de tabela de contagem (BAM + GFF), evidenciaram que a análise da expressão diferencial apresentou uma quantificação das sequências de alta qualidade das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse) contra o genoma de referência de *Elaeis guineensis* (EG5) anotado e disponível no NCBI, evidenciado na Tabela 4.

Todo o processo descrito anteriormente permitiu analisar os dados brutos obtidos por Vieira (2019). Foi possível conseguir até 30 milhões de sequências de alta qualidade por amostra, foi um processo de retirada de adaptadores, sequências de baixa qualidade e qualquer tipo de contaminação. Após a análise de qualidade foi feito o mapeamento, que remete ao processo de alinhamento das sequências das amostras contra o genoma de referência de dendê. O percentual das leituras únicas mapeadas ao genoma de referência foi de 92%, e isso prova que não existe contaminação.

Dando seguimento com as análises, a tabela de contagem é obtida em seguida, esse seguimento faz a contagem de quantas leituras são mapeadas para cada gene ou exon, e a mesma pode ser usada para executar uma análise de expressão diferencial dentro do OmicsBox, evidenciada na Tabela 4. Os resultados adquiridos por essa contagem permitiram quantificar as sequências de alta qualidade das amostras de RNA-seq de plantas de dendê controle e estressadas (5 e 12 dias de estresse) contra o genoma de referência de dendê. O percentual de leituras alinhadas a genes foi bastante alto em todas as amostras analisadas; as leituras alinhadas a não genes foram baixas, não atingindo 20%; os alinhamentos de baixa qualidade ou os que não foram alinhados a nada é de no máximo 0,01%.

Para analisar a diferença entre os grupos comparados (Controle x Estressado 5 dias e Controle x Estressado 12 dias) foi gerado um MDS-Plot, que se refere a uma escala multidimensional relativa à separação do grupo controle e do grupo estressado com diferentes concentrações de NaCl coletados com 5 e com 12 dias (Figura 20). A Figura 21 apresenta uma representação dos genes *up-regulated* e *down-regulated* estressados aos 5 e aos 12 dias. Essas figuras provam que é possível fazer uma boa distinção de genes diferencialmente expressos com os critérios estabelecidos.

Por último, o Heatmap evidencia a associação entre amostras de folha de dendê controle e amostras de folha de dendê estressadas com 5 e com 12 dias. O mapa de calor fornece os símbolos dos 33 genes *up-regulated* encontrados quando a comparação é entre amostras de folha de dendê controle e amostras de folha de dendê estressadas com 5 dias, e os símbolos dos 10 genes *up-regulated* encontrados quando a comparação é entre amostras de folha de dendê controle e estressadas com 12 dias.

Foram selecionados 6 genes responsivos a estresse salino, os quais foram submetidos à anotação estrutural e funcional evidenciado na tabela 6. O gene que corresponde ao LOC105055832, se refere a um aminoácido, os quais são componentes essenciais do metabolismo das plantas, não apenas como constituintes das proteínas, mas também como precursores de importantes metabólitos secundários e como transportadores de nitrogênio orgânico entre os órgãos da planta. O transporte através de membranas intracelulares e translocação de aminoácidos dentro da planta é mediado por transportadores de aminoácidos de membrana (DINKELOO *et al.*, 2017).

O gene LOC105055156 se refere às sulfúriltransferases que constituem uma família de proteína grande e complexa, caracterizada pela presença de um domínio rodânês e implicado em diversos processos moleculares e de sinalização, em algumas plantas, as sulfúriltransferases estão presentes principalmente nos cloroplastos (MOSELER *et al.*, 2019).

O gene LOC105045973 se refere a uma proteína de transferência lipídica não específica-1. O estudo de Gangadhar *et al.* (2016) com análise da expressão do gene StnsLTP1 mostrou diferenças na sua expressão sob estresse por calor, déficit hídrico e salino. Linhagens transgênicas de batata que superexpressam o gene StnsLTP1 exibiram integridade da membrana celular aprimorada sob estresse, como per-oxidação lipídica da membrana e teor de peróxido de hidrogênio reduzidos. Além disso, os transgênicos também exibiram atividade enzimática antioxidante aumentada com acúmulo aumentado de ascorbatos e regulação positiva de genes relacionados ao estresse.

O gene LOC105047536, se refere a uma endocitinase ácida. Estudo realizado por Khalili *et al.* (2018) com estresse salino em trigo, mostrou que as linhagens transgênicas continham a expressão de endocitinase ácida, que está relacionada à defesa contra o estresse oxidativo.

Para aumentar o conhecimento sobre os efeitos da expressão gênica e entender o fenótipo da planta inteira sob estresse, é necessária uma abordagem focada que combine aspectos moleculares, fisiológicos e metabólicos da tolerância ao estresse da planta. A seleção do promotor ou fator de transcrição apropriado a ser usado para a transformação pode ser feita pela melhor compreensão dos processos fisiológicos subjacentes em resposta a diferentes estresses abióticos (SRIVASTAVA, 2019). O gene que corresponde ao LOC105058460, se refere a um fator de transcrição.

O gene LOC105039727 se refere a proteína estrutural da parede celular rica em glicina-2. Muitos estudos avançaram para a compreensão das vias que contribuem para a biossíntese da parede celular e como essas vias são regulados por estímulos externos e internos. Evidências recentes apoiam um modelo no qual certos aspectos da própria parede podem atuar como sinais reguladores do crescimento (RUI; DINNENY, 2019). Componentes moleculares de vias de sinalização que detectam e mantêm a integridade da parede celular começaram a aparecer, incluindo sinais que surgem na parede, sensores que detectam alterações na superfície da célula e módulos de transdução de sinal a jusante. As condições de estresse abiótico e biótico fornecem novos contextos para o estudo da integridade da parede celular, mas ainda assim, a natureza e as consequências das rupturas da parede devido a vários estressores requerem uma investigação mais aprofundada (RUI; DINNENY, 2019).

Foi possível atingir o objetivo específico de prospectar no genoma de palma de óleo (*Elaeis guineensis*) genes responsivos ao estresse salino por meio do “Reference Based Transcriptomics Workflow” e dos critérios estabelecidos: $FDR \leq 0.01$ e $\log_{2}FC \geq 5$. Foi possível, ainda, a realização da anotação estrutural e funcional dos genes prospectados altamente expressos. O fluxograma também permitiu um alto grau de certeza (do ponto de vista estatístico) quanto à diferença de expressão dos genes encontrados na amostra controle e dos genes encontrados nas amostras estressadas com 5 e 12 dias.

O estudo de genes candidatos identificados baseados nas análises de expressão gênica é de grande importância na compreensão do determinismo genético de características de interesse (ALVES, 2015), como a salinidade. A importância de se fazer uma comparação entre a análise *in silico* com a análise *in vivo* é grande, pois a plataforma utilizada para análise *in silico* permite um enorme arcabouço de *softwares* para realização de diversas análises como

a realizada no presente estudo, além selecionar genes diferencialmente expressos com um *background* de estatística confiável, o qual também foi feito no presente trabalho. Seria impossível analisar 20 mil genes de cada vez manualmente. O perfil de expressão obtido a partir de plataformas tecnológicas avançadas precisa ser comprovado na bancada dentro de laboratório (*in vivo*), e por isso a importância dessa comparação (REICHEL, 2016).

4.2 Análise do perfil de expressão *in vivo* de genes responsivos a estresse salino

Seis dos genes encontrados estavam superexpressos tanto em 5 dias como em 12 dias. Com base nos padrões de expressão dos mesmos, foram escolhidos três genes para a devida comparação *in vivo* via qPCR. Comparando os perfis de expressão *in silico* e *in vivo* dos três genes selecionados para análise por qPCR, evidenciados na figura 26, é possível ver que as respostas são bastante diferentes. Essa diferença entre os perfis de expressão pode ser devido ao próprio PCR quantitativo, ao manuseio na bancada, ou ainda, aos pares de primers, e a determinação exata da temperatura de anelamento. Pode ter sido a estratégia usada para selecionar os genes responsivos, na qual ao invés de ser utilizada a análise “Pair Waise”, se utilizou a análise “Time Course”, e a partir daí se realizou a seleção dos genes; é necessário aplicar ainda, mais critérios específicos de seleção.

5 CONCLUSÕES

A plataforma de bioinformática OmicsBox (OmicsBox – Bioinformatics Made Easy, BioBam Bioinformatics, March 3, 2019, <https://www.biobam.com/omicsbox>), na sua versão 1.2.4., módulo “transcritomics”, utilizando o “Reference Based Transcriptomics Workflow” ajustado permitiu identificar genes responsivos ao estresse salino diferencialmente expressos e com uma diferença no nível de expressão esperado.

A estratégia de selecionar genes comparando amostras Controle x Estressado 5 dias e amostras Controle x Estressado 12 dias e, com base nos padrões de expressão dos mesmos, realizar a escolha para a devida comparação *in vivo* via qPCR não se mostrou a melhor estratégia, pois genes que aumentam entre Controle x Estressado 5 dias, mas decaem entre Estressado 5 dias x Estressado 12 dias acabam sendo selecionados também, e não é o objetivo do estudo.

A aplicação do qPCR não gerou os dados esperados, portanto se faz necessário otimizar o pipeline utilizado para seleção e validação dos genes, principalmente no que se diz respeito à seleção dos genes responsivos com o perfil esperado.

Quanto aos objetivos específicos desta seção, os resultados são os seguintes: o primeiro, que visou prospectar no genoma de palma de óleo (*Elaeis guineensis*) genes responsivos ao estresse salino, foi atingido; o segundo objetivo, que visou realizar a anotação estrutural e funcional dos genes prospectados, também foi concluído com sucesso, tendo ao final do trabalho seis genes selecionados. Por fim, o terceiro, que era caracterizar mediante emprego da técnica de qPCR, o perfil de expressão dos genes responsivos a estresse salino selecionados, também foi concluído, porém, tal caracterização foi realizada com apenas três genes, não gerando os resultados esperados. É necessário realizar ajustes e reavaliar o protocolo empregado para realizar o qPCR; e refazer a análise.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. S. C. **Characterization of a candidate gene for drought tolerance in Coffea: the CcDREB1D gene, in contrasting genotypes of Coffea canephora and related species.** 2015. 209 p. Tese (Doutorado em Biologia Integrativa) - AGAP/ Universidade Federal de Lavras, 2015.
- COSTA-SILVA, J.; DOMINGUES, D.; LOPES, F. M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, e0190152, p. 1-18, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>
- DINKELOO, K.; BOYD, S.; PILOT, G. Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. **Seminars in cell & developmental biology**, Academic Press, v. 74, p. 105-113, 2018.
- GANGADHAR, B. H. *et al.* Enhanced tolerance of transgenic potato plants over-expressing non-specific lipid transfer protein-1 (StnsLTP1) against multiple abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1228, 2016.
- INVITROGEN. **SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal**. San Diego. 2010. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/sybrgreener_supermix_uni_man.pdf. Acesso em: 27 nov. 2019.
- JIMÉNEZ-JACINTO, V.; SANCHEZ-FLORES, A.; VEGA-ALVARADO, L. Integrative Differential Expression Analysis for Multiple EXperiments (IDEAMEX): A Web Server Tool for Integrated RNA-Seq Data Analysis. **Front. Genet.**, v. 10, n. 279, p. 1-16, 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.00279
- KHALILI, M.; NAGHAVI, M. R.; YOUSEFZADEH, S. Protein pattern analysis in tolerant and susceptible wheat cultivars under salinity stress conditions. **Acta agriculturae Slovenica**, v. 111, n. 3, p. 545-558, 2018.
- LOWE, R.; SHIRLEY, N.; BLEACKLEY, M.; DOLAN, S.; SHAFEE, T. Transcriptomics technologies. **PLoS Comput Biol**, v. 13, n. 5, e1005457, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
- MOSELER, A. *et al.* Novel insights into the diversity of the sulfurtransferase family in photosynthetic organisms with emphasis on oak. **New Phytologist**, 2019.
- PFÄFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. *In*: BUSTIN, S. A. **A-Z of quantitative PCR**. La Jolla, CA, USA: International Universit Line, 2004. p. 87-112. Disponível em: <https://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2020.
- REICHEL, T., **Análise da expressão dos genes da subfamília dreb em resposta à seca em plantas de Coffea canephora Conilon.** 2016. 88 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp616.

SINGH, R. *et al.* Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 335-339, 2013. DOI: 10.1038/nature12309

SRIVASTAVA, N. Molecular and Biotechnological Tools in Developing Abiotic Stress Tolerance in Wheat. *In*: HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; HOSSAIN, Md. A. **Wheat Production in Changing Environments**. Singapore: Springer, 2019. p. 283-341.

STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. **Nat Rev Genet.**, v. 20, p. 631-656, 2019. DOI: 10.1038/s41576-019-0150-2.

TORRES, L. F., **RNA-Seq em *Coffea arabica*: Genes candidatos em condições de estresse abiótico**. 2017. 192 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

VARGAS, L. H. G. **Prospecção de Gens de Tecido Específico e Metabólitos em *Elaeis spp.*** 2014. 139 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

VIEIRA, L. R. **Respostas morfofisiológicas, metabolômicas e transcritômicas da palma de óleo (*Elaeis guineensis*) aos estresses abióticos de seca e salinidade**. 2019. 160 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo de avaliar se a *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (acesso A10.1) é intolerante a estresse salino, e conseqüentemente poder utilizá-la como planta modelo para validação de genes candidatos a conferir tolerância à salinidade, foi alcançado. O efeito da salinidade na germinação é menor do que se esperava, porém o efeito no desenvolvimento inicial e no segundo estágio de desenvolvimento mostra uma relação inversamente proporcional entre o aumento na concentração de NaCl e a redução de todas as variáveis medidas.

S. viridis se mostrou intolerante ao estresse aplicado mesmo quando essa intolerância se torna mais evidente, quando a condutividade elétrica é superior a aproximadamente 15 dSm⁻¹ (NaCl > 0,4 g / 100 g de substrato). Com os dados obtidos neste estudo, é possível saber exatamente como trabalhar com salinidade nessa espécie, ou seja, permite ter conhecimento de qual concentração trabalhar, em quanto tempo esperar uma resposta significativa e ter certeza do comportamento desta planta sob diferentes concentrações de NaCl, tanto no meio de cultura como no substrato. Todos os objetivos específicos desta seção foram atingidos. Assim, é possível inferir que o acesso A10.1 de *S. viridis* pode ser utilizado como planta modelo em estudos de genômica funcional para validar genes candidatos a conferir tolerância à salinidade.

O objetivo de avaliar se o perfil de expressão de genes de *Elaeis guineensis* Jacq. responsivos a estresse de salinidade, observado mediante análise *in silico*, é igual ao observado *in vivo*, foi alcançado.

O processo de seleção de genes diferencialmente expressos, com um grau estatístico de 99% de certeza, se mostrou eficiente para selecionar os referidos genes. É preciso realizar alguns ajustes, porém os dois primeiros objetivos específicos desta seção foram alcançados. No que diz respeito ao terceiro e último objetivo específico, a comparação mediante qPCR precisa ser refeita com ajustes.

No geral, os dados do presente trabalho fornecem subsídios para futuros estudos com objetivos semelhantes e de mesma área. A sugestão é que se mude a estratégia de seleção dos genes, e que ao invés de se utilizar a análise “Time-Course”, se utilize a “Pair-Waise”, além de ser preciso definir outros critérios e mais específicos de seleção. O protocolo utilizado para análise do perfil de expressão utilizando o PCR quantitativo não gerou resultados confiáveis devido ao alto erro padrão, além de que em situações em que a expressão deveria ser zero, houve expressão gênica; sendo, portanto, necessário realizar ajustes e reavaliar o protocolo empregado para realizar o qPCR; e refazer a análise.