

PERFIL DE EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DE GENES HSFs EM ARROZ

**CÁSSIA STAFEN¹; ANA MARINA PEDROLO²; ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA²;
CAMILA PEGORARO³**

¹*Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Centro de Genômica e Fitomelhoramento – cassiastafen@outlook.com*

²*Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Centro de Genômica e Fitomelhoramento – anapedrolo@gmail.com; acostol@terra.com.br*

³*Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Centro de Genômica e Fitomelhoramento – pegorarocamilanp@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Mudanças climáticas causadas por processos naturais e fatores antrópicos podem resultar na maior intensidade de estresses abióticos, levando a redução da produtividade agrícola. Dentre esses estresses está a seca, que é um evento climático extremo, com alto impacto na agricultura (BOUTRAA et al. 2010); a salinidade, visto que um terço das áreas irrigadas do mundo é afetado por salinização (CONOR et al., 2012); e o frio, que limita o crescimento, a produtividade e a distribuição geográfica das culturas agrícolas (LIU et al., 2013).

O arroz (*Oryza sativa*) é uma das mais importantes culturas em termos de valor econômico e é um dos cereais mais produzidos e consumidos em todo o mundo. Assim como os demais cereais, o rendimento do arroz é dependente das condições ambientais (REYNOLDS et al., 2016). Durante o processo evolutivo, as plantas tem desenvolvido mecanismos moleculares de transdução de sinais para responder às condições ambientais adversas (PANDEY et al., 2016).

Dentre os genes de resposta a estresses abióticos em vegetais pode-se destacar as proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* – HSPs). HSPs atuam na manutenção da conformação funcional das proteínas e previnem a agregação dessas proteínas em condições de estresse, auxiliando na sobrevivência das células (WANG et al., 2004). A transcrição das HSPs é regulada por fatores de transcrição de choque térmico (*Heat Shock Factor* – HSF), os quais desempenham um papel central na regulação das respostas à diferentes estresses abióticos em plantas. Em arroz, foram identificados 25 genes da família HSF, que embora pertencentes à mesma família, respondem de maneira diferencial em condições de estresse (MITTAL et al., 2009). Dessa forma, é necessário identificar quais genes são expressos em cada condição ambiental e como ocorre a regulação da expressão desses genes. Essa informação poderá ser utilizada no desenvolvimento de cultivares tolerantes aos estresses por seca, frio e salinidade.

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de genes da família HSF sob condições de estresse por seca, salinidade e frio, e avaliar como ocorre a regulação desses genes nessas condições.

2. METODOLOGIA

Vinte e cinco genes da família HSF em arroz (*Oryza sativa*) foram identificados a partir de uma lista previamente reportada por MITTAL et al., (2009). As sequências codificadoras correspondentes a cada gene foram obtidas no banco de dados MSU Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) e

as sequências correspondentes a região promotora (1kb upstream) foram obtidas no banco de dados The Rice Annotation Project (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>).

O perfil de expressão *in silico* foi obtido a partir do banco de dados de expressão gênica *Genevestigator* (<https://genevestigator.com/gv/>) (ZIMMERMANN et al. 2008). Os dados de expressão utilizados foram provenientes de um experimento realizado com plântulas de arroz da cultivar IR64 (*Oryza sativa* spp. *indica*) submetidas aos estresses por frio (4°C por 3 hs), seca (papel seda seco por 3 hs em 28°C) e salinidade (NaCl 200 mM por 3 hs em 28°C). Foram utilizados apenas resultados de expressão com p-value <0,001. Os dados de expressão foram exportados do *Genevestigator* e carregados no programa *MeV:MultiExperiment Viewer* (TM4 MeV) (SAEED et al., 2003).

A análise dos motivos foi realizada utilizando o programa *Multiple Em for Motif Elicitation - MEME Suite* (<http://meme-suite.org/tools/meme>) (BAILEY et al., 2009). A identificação de elementos *cis* na região promotora de cada gene foi feita utilizando o programa *PLANTCIS* (http://www.microsatellite.org/cis_input.html), que utiliza elementos *cis* a partir do banco de dados *Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements - PLACE* (HIGO et al. 1998). Apenas elementos com p-value ≤0,01 foram considerados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de expressão *in silico* dos 25 genes da família HSF em arroz diferiu sob as condições de estresses por frio, seca e salinidade (Fig. 1A). Um grupo de dez genes HSFs apresentou perfil de expressão similar entre os estresses por seca e salinidade, sendo induzidos nessas condições. Esse resultado indica que esse grupo está envolvido na resposta à desidratação celular, ocasionada pelos estresses por seca e salinidade. Esses genes são considerados candidatos para estudos mais detalhados visando a obtenção de plantas tolerantes a esses estresses. Em estresse por frio verificou-se que a maioria dos genes teve a expressão inibida, exceto os genes LOC_Os01g53220, LOC_Os02g32590 e LOC_Os03g12370. O gene LOC_Os01g53220 foi induzido sob os três estresses estudados, se constituindo num excelente candidato para superexpressão visando tolerância a esses estresses. O gene LOC_Os05g45410 foi induzido apenas em condições de salinidade, sendo alvo de estudos visando plantas tolerantes a esse estresse.

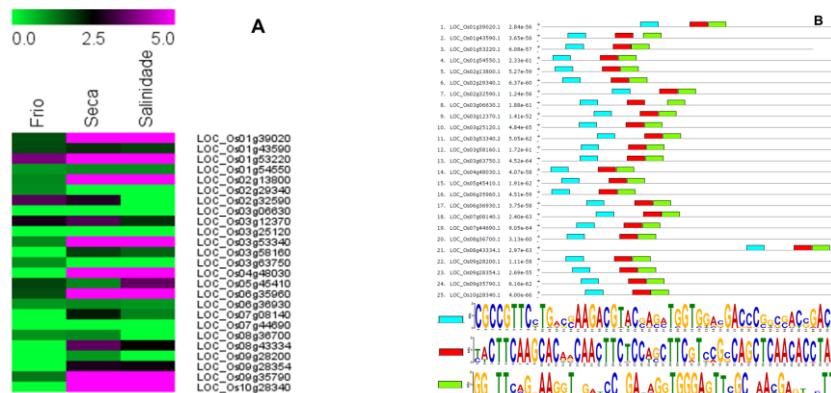


Figura 1. (A) Perfil de expressão *in silico* de genes HSFs em arroz sob condições de estresse por frio, seca e salinidade. Cor verde representa baixo nível de transcritos, cor preta representa médio nível de transcritos e cor rosa representa alto nível de transcritos. (B) Presença de motivos conservados entre os genes HSFs em arroz.

Buscando verificar se os genes com perfil de expressão similar apresentavam regiões conservadas na sequência codificadora (CDS), foram avaliados os motivos presentes nessas sequências. Com base nos resultados obtidos, verifica-se que todos os genes *HSFs* apresentam os mesmos motivos conservados na CDS, diferindo apenas em algumas bases (Fig. 1.B). Essa informação sugere que a presença de motivos na CDS não está associada com a regulação da expressão desses genes.

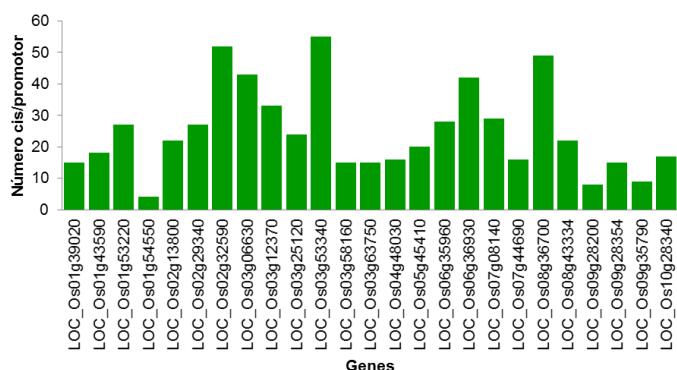


Figura 2. Número de elementos *cis* presentes na região promotora (1kb) de cada gene *HSF* de arroz.

Por outro lado, verificou-se que a região promotora dos genes *HSFs* apresentam diferentes elementos *cis* e em diferentes quantidades (Fig. 2). Elementos *cis* são sequências de DNA presentes na região promotora de genes que são reconhecidas por fatores de transcrição, mediando a resposta celular desses genes em diferentes condições (FRANCO-ZORRILLA et al., 2014). Nesse estudo foram observados diferentes elementos *cis* nos diferentes promotores, onde cada elemento apresentou ocorrência variando de 1 a 10 (dados não mostrados). Verificou-se que o número total de elementos *cis* não está relacionado com perfil de expressão dos genes *HSFs* frente aos diferentes estresses estudados (Fig. 1A e Fig. 2). No entanto, observou-se que genes com expressão similar apresentam determinados elementos em comum, como é o caso dos genes *LOC_Os09g35790* e *LOC_Os10g28340*, que apresentam o elemento *cis* ACCTTCC (BOXLCOREDCPAL) na região promotora. Porém, esse elemento não foi observado nos demais genes que apresentam expressão similar. Esse resultado sugere que a regulação da expressão de genes *HSFs* está associada a presença de determinado elementos *cis* na região promotora, porém essa regulação ocorre de forma complexa, não havendo um padrão entre os membros da família HSF.

Dentre os promotores avaliados, observou-se ainda a presença dos elementos *cis* ACGTG (ABRELATERD1) e GCCGAC (DRECRTCOREAT), que atuam em resposta inicial a desidratação e como sítio de ligação dos fatores de transcrição responsivos a desidratação (*Dehydration responsive element binding* – DREB), respectivamente. DREB1 é um fator de transcrição associados ao frio, e DREB2 à seca e salinidade (LATA e PRASAD, 2011). Esse resultado confirma a participação da família HSF em resposta aos estresses estudados.

Este estudo encontra-se em fase inicial, nas próximas etapas serão avaliados quais elementos *cis* estão presentes na região promotora de cada gene, qual a ocorrência desses elementos e a qual condição estão associados.

4. CONCLUSÕES

O gene *LOC_Os01g53220* é um candidato potencial para estudos de transformação genética visando tolerância aos estresses abióticos por frio, seca e salinidade. Sugere-se que a expressão diferencial de genes *HSFs* em arroz sob condições de estresse é decorrente da presença de diferentes elementos *cis* na região promotora desses genes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, T.L.; BODÉN, M.; BUSKE, F.A.; FRITH, M.; GRANT, C.E.; CLEMENTI, L.; REN, J.; LI, W.W.; NOBLE, W.S. "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching". **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 202-208, 2009.
- BOUTRAA, T.; AKHKHA, A.; AL-SHOAIBI, A.A.; ALHEJELI A.M. Effect of water stress on growth and water use efficiency (WUE) of some wheat cultivars (*Triticum durum*) grown in Saudi Arabia. **J. Taibah Univ. Sci.**, 3, p.39-48, 2010.
- CONNOR, J.D.; SCHWABE, K.; KING, D.; KNAPP, K. Irrigated agriculture and climate change: The influence of water supply variability and salinity on adaptation. **Ecological Economics**, v. 77, p. 149-157, 2012.
- FRANCO-ZORRILLAA J.M.; LÓPEZ-VIDRIEROA, I.; CARRASCOB, J.L.; GODOYA, M.; VERAB, P.; SOLANOC, R. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. **PNAS**, v. 111, n. 6, p. 2367-2372, 2014.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; HIGO, H. PLACE: A database of plant cis-acting regulatory DNA elements. **Nucleic Acids Research**. v. 26, n. 1, p. 358-359. 1998.
- LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-18, 2011.
- LIU, W.; YU, K.; HE, T.; LI, F.; ZHANG, D.; LIU, J. The Low Temperature Induced Physiological Responses of *Avena nuda* L., a Cold-Tolerant Plant Species. **The Scientific World Journal**, 2012.
- MITTAL, D.; CHAKRABARTI, S.; SARKAR, A.; SINGH, A.; GROVER, A. Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 785–795, 2009.
- PANDEY, G.K.; PANDEY, A.; PRASAD, M.; BÖHMER, M. Editorial: Abiotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomic Intervention. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, artigo 681, 2016.
- REYNOLDS, M.P. et al. An integrated approach to maintaining cereal productivity under climate change. **Global Food Security**, v. 8, p. 9-18, 2016.
- SAEED, A.I et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**. v. 34, n. 2, p. 374-378. 2003.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 244-252, 2004.
- ZIMMERMANN, P.; LAULE, O.; SCHMITZ, J.; HRUZ, T.; BLEULER, S.; GRUISSEM, W. Genevestigator transcriptome meta-analysis and biomarker search using rice and barley gene expression databases. **Molecular Plant**, v.1, p. 851-857. 2008.