

PERFIL DE EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DE GENES *HSFs* EM ARROZ

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

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

²Universidade 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 $\leq 0,01$ 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.

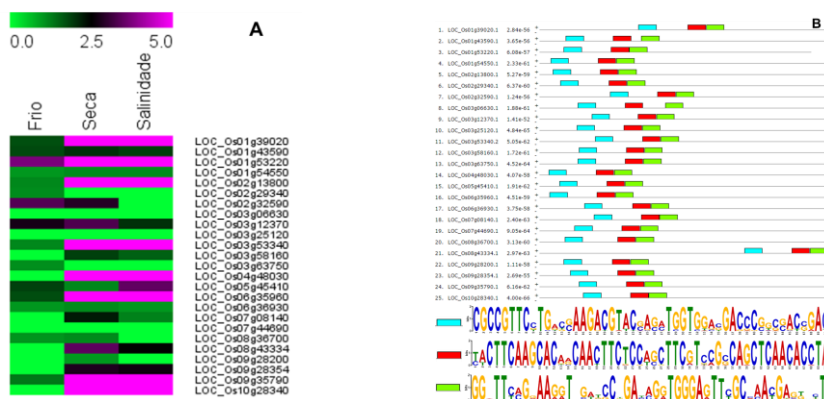


Figura 1. (A) Perfil de expressão *in silico* de genes *HSFs* em arroz sob condições de estresse por frio, seca e salinidade. Cor verde representa baixo nível de transcritos, cor preta representa médio nível de transcritos e cor rosa representa alto nível de transcritos. **(B)** Presença de motivos conservados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

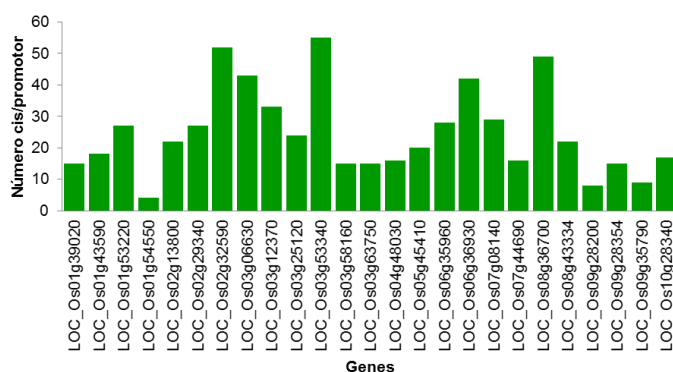


Figura 2. Número de elementos *cis* presentes na região promotora (1kb) de cada gene *HSF* de arroz.

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 (BOXLCORED CPAL) 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 determinados 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 (DRECR COREAT), 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.