

PERFIL DE EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO GENE *WRKY11* EM ARROZ SOB CONDIÇÕES DE DEFICIÊNCIA DE O₂

LUCIANA DALLEGRAVE SCHROEDER¹; VIVIAN EBELING VIANA²; ANTONIO
COSTA DE OLIVEIRA²; CAMILA PEGORARO³

¹Universidade Federal de Pelotas – luslovato@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – vih.viana@gmail.com/acostol@terra.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A submergência é limitante para as plantas devido a redução dos níveis de oxigênio (O₂) na rizosfera durante a baixa taxa de difusão do O₂ na água, o que pode causar queda de produtividade. Nessa condição, as plantas respondem com mudanças rápidas e específicas em nível de transcrição e tradução (HEIDENREICH et al., 2006). Essa disparidade entre a oferta e demanda de O₂ resulta na ativação da expressão gênica (TIANA et al., 2012). A regulação da expressão gênica como resposta molecular, frente a baixas taxas de O₂, envolve diversos fatores de transcrição (FT). Mais de 180 genes que codificam para FTs, incluindo *WRKY*, são altamente expressos sob condições de hipoxia em *Arabidopsis* (LICAUSI, 2011). Com base nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar o perfil de expressão do gene *OsWRKY11* em plantas de arroz sob estresse por submergência e verificar sua relação de ortologia com genes no milho.

2. METODOLOGIA

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado das cultivares Nipponbare, BR IRGA 409 e Epagri 108 foram germinadas seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Posteriormente as plântulas foram transferidas para recipientes contendo areia e foram regados 2 vezes ao dia com água e solução nutritiva de YOSHIDA (1976), permanecendo nestas condições por 7 dias. No 14º dia, estágio de desenvolvimento V3, foi realizada a coleta das plântulas controle (sem estresse). O restante dos recipientes com as plântulas permaneceram sob condição de submergência por 6, 12, 24 e 48 horas. O experimento foi realizado em triplicata, e completamente casualizado. As amostras de parte aérea foram coletadas e as extrações de RNA foram realizadas em triplicatas biológicas, utilizando o reagente TRIzol® (InvitrogenTM®) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a síntese do cDNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNaseI (Invitrogen TM®) e o cDNA fita simples foi obtido a partir de 2µg de RNA total, utilizando o kit SuperScript™III First-Strand System for RT-PCR (InvitrogenTM®), de acordo com as recomendações do fabricante. Os inicializadores para qRT-PCR foram desenhados através do programa Primer Express® respeitando os parâmetros exigidos pela empresa Applied Biosystems®: *OsWRKY11* (LOC_Os01g43650.1) F: 5'-AGGACACGGTGGTCAAGCAG-3' e R: 5'-TGTCGTGGCTCGTCACATCC-3' e para o gene constitutivo *eF1-α* F: 5'-TGGTATGGTGGTGACCTTTG-3' e R: 5'-GTACCCACGCTTCAGATCCT-3'. A quantificação relativa de cada gene foi feita como descrito por Livak e Schmittgen (2001). Para qRT-PCR foi utilizado 12,5 µl do kit Fast Start Universal SYBR Green Master Mix (InvitrogenTM®), as reações foram realizadas no termociclador ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems®) e o experimento foi delineado como o descrito por Bustin et al., 2009. Foram realizadas ANOVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo programa SAS 9.3 (Statistical Analysis System). A expressão *in silico* do gene *OsWRKY11* foi obtida utilizando a ferramenta de

metanálise Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>), sendo utilizados dados de microarranjo provenientes de diferentes experimentos. O experimento testando seca e salinidade foi conduzido utilizando a cultivar IR64, para calor foi utilizado a cultivar Zhonghua11, para germinação anaeróbica a cultivar Amaroo e para submergência a cultivar M202. O alinhamento dos genes *OsWRKY11* e *AC198725.4_FGT009* em milho, para verificar regiões conservadas, foi realizado no banco de dados PlantPan 2.0 (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/index.html>). A fim de encontrar elementos de regulação *cis* (CREs) foi utilizado PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) considerando $p \leq 0.05$ para eliminar falsos positivos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão *in silico* do gene *WRKY11* foi avaliada nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta e nos diferentes órgãos do vegetal. Foi possível verificar que, em condições normais, o gene *WRKY11* mantém expressão constitutiva nos diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 1A) assim como nos diferentes órgãos vegetais (Figura 1B).

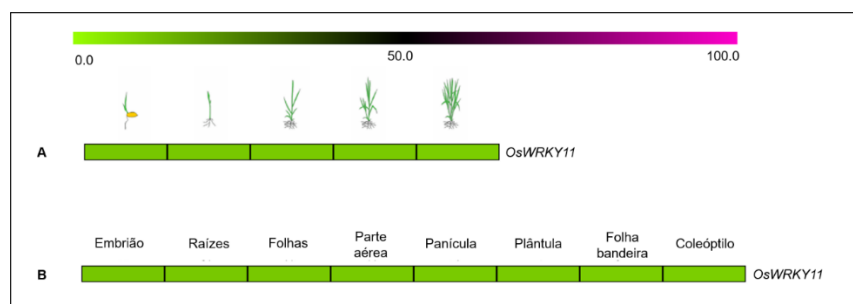


Figura 1: Perfil de expressão *in silico* do gene *OsWRKY11*. **A:** expressão do gene *OsWRKY11* nos diferentes estádios de desenvolvimento do arroz; **B:** expressão *OsWRKY11* nos diferentes órgãos do arroz.

Com relação à expressão *in silico* em diferentes estresses, foi observado uma maior expressão do gene *WRKY11* nos estresses de seca, salinidade e calor (Figura 2A), o qual pode ser explicado devido a semelhança fisiológica do estresse pois a planta necessita realizar o fechamento dos estômatos afim de evitar a perda de água nas condições de seca e calor e evitar o desequilíbrio osmótico em salinidade.

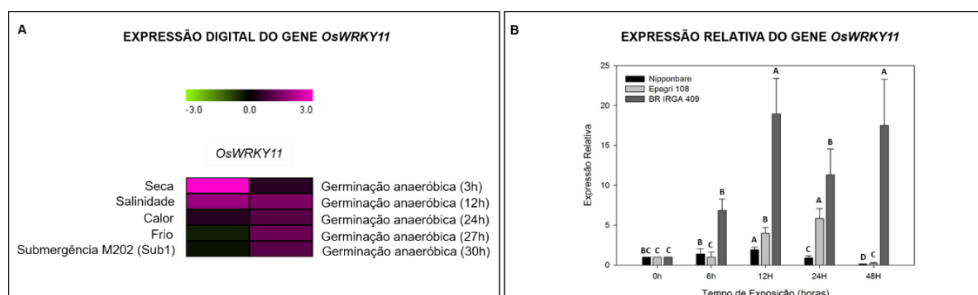


Figura 2: expressão do gene *OsWRKY11*. **A:** Perfil de expressão *in silico* em diferentes estresses abióticos em plântulas de arroz e na germinação anaeróbica (3h, 12h, 24h, 27h e 30h); **B:** Perfil de expressão do gene *OsWRKY11* obtido através de qRT-PCR, analisado no tratamento controle (0h) e em quatro tempos de submergência (6h, 12h, 24h e 48h), na parte aérea de três genótipos de arroz irrigado. As letras nas colunas correspondem a diferença estatística significativa nas médias de QR para cada genótipo entre os tratamentos.

Ainda, não houve alterações na expressão do gene *WRKY11* no estresse por frio e, importante frizar que não houve expressão desse gene em plantas tolerantes a submergência, as quais contêm o gene *Sub1* o qual confere tolerância ao estresse (Figura 2A). De acordo com perfil de expressão relativa obtido através da técnica de qRT-PCR na parte aérea de plântulas de arroz, foi possível verificar o envolvimento do gene *WRKY11* em resposta ao estresse por submergência, uma vez que houve um aumento no número de transcritos desse gene nas cultivares Epagri 108 e BR IRGA 409 (Figura 2B). A cultivar BR IRGA 409 apresentou maior abundância de transcritos dentre os genótipos estudados e uma resposta precoce de expressão, sendo os maiores valores significativos obtidos nos tratamentos de 12h e 48h (Figura 2B). A cultivar Epagri 108 também apresentou alterações no número de transcritos, porém em resposta mais tardia ao estresse, apresentando maior abundância significativa no tratamento de 24h sob estresse, deste momento em diante a expressão deste gene foi suprimida (Figura 2B). A cultivar Nipponbare não demonstrou suscetibilidade ao estresse, apenas foi detectado uma pequena alteração na expressão no tratamento de 12h seguido pela supressão do gene no tratamento de 48h (Figura 2B).

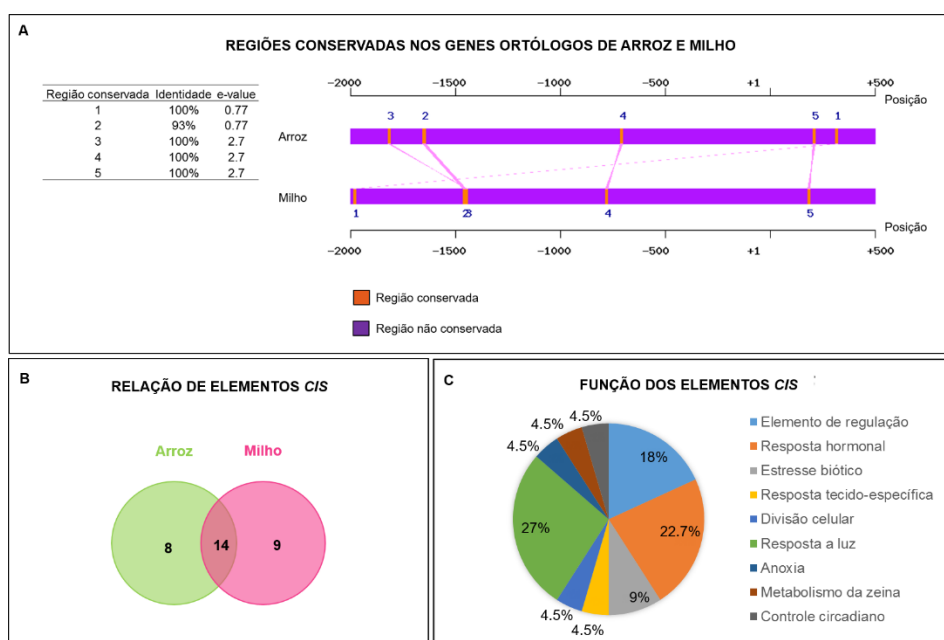


Figura 3: Análise da região codificadora e promotores dos genes *OsWRKY11* e *AC198725.4_FGT009* ortólogos em arroz e milho. **A:** Alinhamento dos genes ortólogos de arroz e milho demonstrando as regiões conservadas na região codificadora destes genes; **B:** Diagrama de Venn demonstrando a relação de elementos de regulação *cis* encontrados nos promotores dos genes ortólogos; **C:** Relação de frequência de função dos elementos de regulação *cis* encontrados nos promotores dos genes ortólogos.

Na análise de ortologia ao *OsWRKY11* em milho, *AC198725.4_FGT009*, verificou-se que há regiões conservadas na sequência codificadora dos genes nas duas espécies (Figura 3A), indicando uma possível homologia de função, sendo possível o gene *AC198725.4_FGT009* também está envolvido em resposta ao estresse por submergência. Ainda, análises nos promotores, região reguladora da transcrição do gene, demonstrou mais uma evidência de homologia de função. Foram encontrados 22 CREs no promotor do gene *OsWRKY11* e 23 CREs no promotor do gene *AC198725.4_FGT009* em milho, destes, 14 foram encontrados em comum entre os dois promotores (Figura 3B). Este dado sugere que estes

genes possuem uma regulação muito similar e podem estar envolvidos em funções comuns. Promotores de genes responsivos a estresses por baixas taxas de O₂ são propensos a compartilhar motivos comuns e podem ser regulados por um conjunto de FT, demonstrando assim a importância na identificação dos CREs nas regiões promotoras, pois fornecem um meio de identificar novos mecanismos de redes de regulação transcricional em resposta ao estresse (LIU, 2005). Ainda, uma análise funcional dos CREs encontrados nos promotores, foi realizada, e demonstrou que a maioria dos CREs estão caracterizados como envolvidos em respostas a alterações hormonais, luz e envolvidos na regulação basal da transcrição (Figura 3C). Interessante destacar que foi encontrado um CRE conhecido pelo envolvimento na resposta a anoxia, o qual foi encontrado em ambos promotores do gene em arroz e em milho. Estes dados indicam que, muito provavelmente, este CRE foi responsável para a ativação da transcrição do gene e explica a expressão do gene *OsWRKY11* em resposta ao estresse por submergência. Ainda, os resultados sustentam as informações de homologia de função entre os genes ortólogos nas duas espécies estudadas. Futuros estudos funcionais do gene analisado e dos CREs encontrados devem ser realizados afim de elucidar a regulação destes genes em arroz e milho e, ainda fornecem informações para estudos de tolerância a submergência em ambas espécies.

4. CONCLUSÕES

O gene *WRKY11* está envolvido na resposta em tolerância ao estresse por submergência e apresenta estruturas conservadas na região reguladora e codificadora ao ortólogo em milho indicando homologia de função.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 2009.
- HEIDENREICH, B.; BIEBER, E.; SANDERMANN, H.; ERNST, D. Identification of a new member of the WRKY family in tobacco. **Acta Physiologie Plantarum**, v. 8, n. 2, p:117-125, 2006.
- LICAUSI, F. Regulation of the molecular response to oxygen limitations in plants. **New Phytologist**, v.190, p:550–555, 2011.
- LIVAK K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. **Methods**, v25, p:402-408, 2001.
- LIU, F.; VANTOAI, T.; MOY, L. P.; BOCK, G.; LINFORD, L. D.; QUACKENBUSH, J. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.137, p:1115–1129, 2005.
- TIANA, M.; VILLAR, D.; PÉREZ-GUIJARRO, E.; GÓMEZ-MALDONADO, L.; MOLTO, E.; FERNÁNDEZ-MIÑA, A.; GÓMEZ-SKARMETA, J. L.; MONTOLIU, L.; DEL PESO, L. A role for insulator elements in the regulation of gene expression response to hypoxia. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.5, p.1916– 1927, 2012.
- YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. Laboratory manual for physiological studies of rice. **Los Baños: IRRI**, 1976.