

Perfil transcricional dos fatores de transcrição Whirly em arroz sob diferentes estresses

ALICE PEREIRA DE JESUS¹; LUCIANA DALLEGRAVE SCHROEDER²; VÍVIAN EBELING VIANA²; VIVIANE KOPP DA LUZ²; CARLOS BUSANELLO²; CAMILA PEGORARO³

¹Universidade Federal de Pelotas – alice.pereira@hotmail.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – luciana.biotechnologia@gmail.com; vih.viana@gmail.com; vivikp05@hotmail.com; carlosbuzza@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – pegorocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Whirlies formam uma pequena família de fatores de transcrição (FTs) que se ligam a fita simples de DNA e são encontrados principalmente no reino vegetal (MARÉCHAL et al., 2008). Em arroz (*Oryza sativa* L.), foram identificadas apenas duas proteínas na família Whirley (DESVEAUX et al., 2005). Durante estresses bióticos, foi identificado que os Whirley se ligam com alta afinidade na fita simples de DNA especificamente no elemento de regulação *cis* (CRE) chamado *elicitor response elemento* (ERE) (MARÉCHAL et al., 2008). Alguns estudos têm reportado o papel dos FTs Whirley em resposta a estresses bióticos em *Arabidopsis thaliana* e batata (revisado em MARÉCHAL et al., 2008). No entanto, pouco se sabe da função dos FTs Whirley frente a estresses bióticos e abióticos em arroz. Sendo assim, este estudo teve como objetivo analisar o perfil transcricional dos FTs Whirley de arroz sob diferentes estresses bióticos e abióticos.

2. METODOLOGIA

Avaliou-se o perfil transcricional *in silico* dos genes *OsWhy2* (*Os02g0158400*) e *OsWhy6* (*Os06g0145800*), utilizando-se a ferramenta *Genevestigator* (<https://genevestigator.com/gv/>), a partir de dados de microarranjo em estruturas da planta, estádios de desenvolvimento, estresses bióticos e abióticos. A região promotora dos genes *OsWhy2* e *OsWhy6* (1Kb), obtida no banco de dados RAP-DB (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) foi analisada quanto a presença de elementos de regulação *cis* (CREs) utilizando o banco de dados PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

O perfil transcricional dos genes *OsWhy2* e *OsWhy6* foi analisado em plântulas de arroz dos genótipos Nipponbare, Epagri 108 (tolerante) e BR IRGA 409 (sensível) sob estresse por excesso de ferro em cultivo hidropônico. Inicialmente as plântulas foram mantidas em solução nutritiva (YOSHIDA et al., 1976), com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 25°C por 14 dias. Posteriormente, parte das plantas foi transferida para solução nutritiva suplementada com 1 mM (300 mg L⁻¹) de sulfato ferroso (FeSO₄·7H₂O) em pH 4.0 (ELEC et al., 2013), enquanto que plântulas controle foram também transferidas para uma nova solução nutritiva. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, cada uma composta por 30 plântulas. As raízes foram coletadas 8 dias após a indução do estresse e mantidas em -80°C até o momento da extração do RNA.

O RNA total foi extraído de 2 g de tecido macerado utilizando TRIzol Reagent™ (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram tratadas com DNaseI (Invitrogen™). A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro e a qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose. Em cada amostra foi realizada a transcrição

reversa em cDNA utilizando o kit comercial SuperScript® III First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen™) a partir de 2 µg de RNA.

As reações em reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa foram realizadas utilizando o cDNA de cada amostra, DNA polimerase Go Taq Green (Promega) e oligonucleotídeos específicos para os genes alvos *OsWhy2* (*foward*: TTTGCAGCAGACGAGAACAC e *reverse*: TGCTGAAGCTTGGCAGTATG) e *OsWhy6* (*foward*: TTTCAGGGGAGGAGTGATG e *reverse*: CGATGTTTCAGGAGACGGTTT). Como controle da reação foi utilizado oligonucleotídeos para o gene normalizador *OsEf1-α* (*foward*: TGGTATGGTGGTGACCTTTG e *reverse*: GTACCCACGCTTCAGATCCT) (JAIN et al., 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados de expressão *in silico* observou-se que os genes *OsWhy2* e *OsWhy6* são expressos nos tecidos vegetais e durante o desenvolvimento da plântula em condições normais (Figura 1A). Estes dados indicam que os genes codificadores do fator de transcrição Whirly tem envolvimento no desenvolvimento da plântula. As análises *in silico* demonstraram que, em geral, os genes *OsWhy2* e *OsWhy6* são regulados negativamente ou não apresentam alteração na expressão frente a estresses bióticos (Figura 1B). No entanto, um aumento de expressão do gene *OsWhy6* foi verificado quando submetido a infecção por *Xanthomonas oryzae*, indicando envolvimento deste gene na resposta ao estresse (Figura 1B). Sob estresse por anoxia verificou-se um aumento de expressão de ambos *OsWhy2* e *OsWhy6* (Figura 1C). Estes resultados sugerem o envolvimento desses genes na resposta a deficiência de oxigênio. Quando sob submersão (no genótipo tolerante Sub1) e durante o estresse por déficit hídrico, *OsWhy2* não demonstrou alteração de transcritos, no entanto, *OsWhy6* foi regulado negativamente evidenciando sua participação na resposta a estes estresses (Figura 1C).

A participação desses genes em resposta a estresses já havia sido identificada em um estudo de transcriptoma conduzido no genótipo de arroz indico IR64, o qual demonstrou o aumento da expressão gene *OsWhy6* em plantas submetidas ao estresse hídrico (RAY et al., 2011). No momento, sabe-se que os FTs Whirly estão envolvidos em respostas de defesa e podem desempenhar funções no cloroplasto e nas mitocôndrias em *Arabidopsis thaliana* e batata (*Solanum tuberosum*) (DESVEAUX et al., 2005; MARECHÁL et al., 2008). Ainda, Ray e colaboradores (2011) demonstraram que o *OsWhy6* está envolvido no desenvolvimento da panícula da planta de arroz.

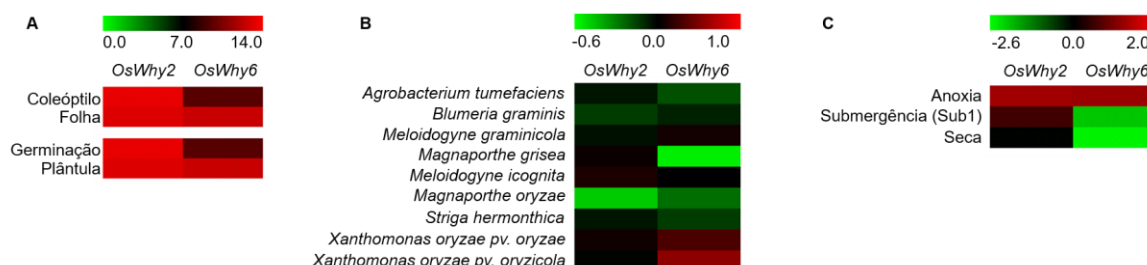


Figura 1: Análise *in silico* do perfil de expressão transcricional dos genes *OsWhy2* e *OsWhy6*. A: perfil de expressão nos tecidos e durante o desenvolvimento da plântula; B: perfil de expressão durante estresses bióticos; C: perfil de expressão durante estresses abióticos.

Considerando o envolvimento dos fatores de transcrição *OsWhy* na resposta a estresses abióticos buscou-se avaliar a expressão desses genes sob

estresse por excesso de ferro. De acordo com o observado em relação ao gene normalizador *OsEf1-α*, foi possível verificar que as amostras apresentam a mesma concentração de cDNA total dentro de cada condição, indicando que as diferenças de expressão encontradas para os genes alvos *OsWhy2* e *OsWhy6* são realmente devido ao acúmulo diferencial de transcritos (Figura 2). Observou-se que os genes *OsWhy* estão expressos na condição sem estresse em plântulas com 22 dias de vida, indicando o envolvimento destes genes durante o desenvolvimento, como o observado na análise transcricional *in silico*. Quando analisado a expressão do gene *OsWhy6* foi possível observar que existe um padrão de expressão entre as subespécies de arroz, e esse gene apresentou menor expressão no genótipo de arroz japonico Nipponbare (Figura 2C). Analisando os genes *OsWhy* na condição estresse comparado a condição controle foi possível verificar um aumento de expressão do gene *OsWhy6* (Figura 2C e 2D) quando sob excesso de ferro, no entanto, não foi possível concluir em relação a expressão do gene *OsWhy2* devido a diferença de concentração dos cDNAs observadas durante a expressão do gene *OsEf1-α* (Figura 2A e 2B). Para confirmar estes dados, novas análises de expressão devem ser conduzidas em PCR quantitativa em tempo real a fim de quantificar precisamente o acúmulo de transcritos em cada amostra.

Diversos FTs foram reportados por estarem diferencialmente expressos sob estresse por excesso de ferro em arroz, dentre eles FTs das famílias NAC, bZIP e WRKYs (FINATTO et al., 2015). No entanto, não há estudos disponíveis na literatura referente aos FTs Whirly em arroz relacionados ao excesso de ferro e tampouco a nenhum outro estresse.

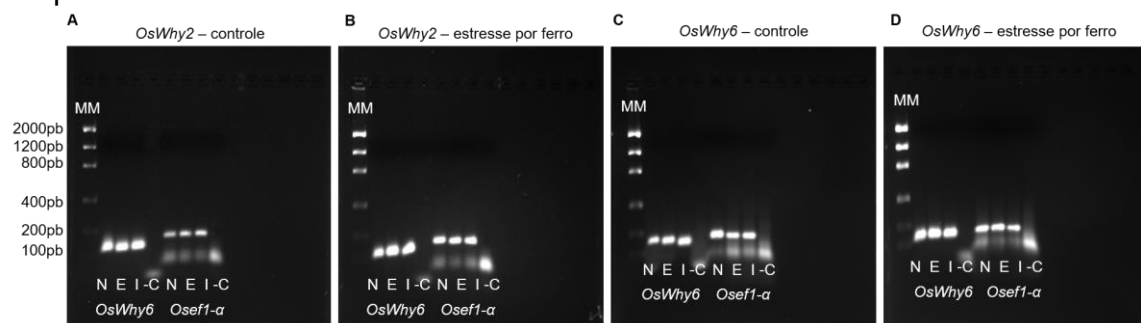


Figura 2: Perfil de expressão dos genes *OsWhy2* e *OsWhy6* sob estresse por excesso de ferro em arroz. Expressão do gene *OsWhy2* e o normalizador *OsEf1-α* na condição sem estresse (controle) (A) e na condição estresse por excesso de ferro (B). Expressão do gene alvo *OsWhy6* e o normalizador *OsEf1-α* na condição sem estresse (controle) (C) e na condição estresse por excesso de ferro (D). MM: Marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen™); N: Nipponbare; E: Epagri 108; I: BR IRGA 409; -C: controle negativo da reação.

O estudo de FTs é muito importante no melhoramento de plantas para a tolerância a estresses, pois FTs regularem a expressão de diversos outros genes através da ligação aos CREs, resultando em ativação de genes, e consequentemente, modificações fisiológicas frente ao estresse (BANERJEE; ROYCHOUDHURY, 2015). Analisando a constituição de CREs nos promotores dos genes *OsWhy*, foi possível observar o compartilhamento da maioria dos CREs (Figura 3A). Estes dados indicam que os genes *OsWhy* apresentam uma regulação similar. No entanto, a diferença entre os promotores é observada quando se analisou a função dos CREs constituintes dos promotores. O promotor do gene *OsWhy2* apresenta um CRE exclusivo relacionado com o controle do ritmo circadiano (Figura 3B). Por outro lado, o promotor do gene *OsWhy6*

apresenta maior quantidade de CREs envolvidos na regulação transcricional do promotor e na expressão tecido-específica (Figura 3B).

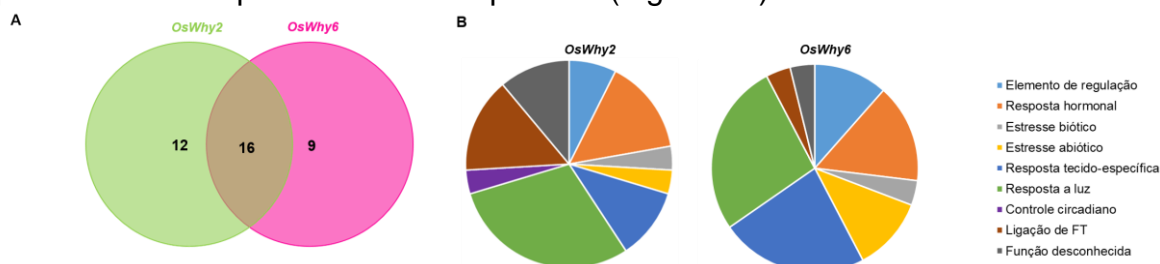


Figura 3: Constituição de elementos de regulação *cis* nos promotores dos genes *OsWhy*. A: diagrama de Venn demonstrando o número e o compartilhamento de elementos de regulação *cis* entre os promotores dos genes *OsWhy2* e *OsWhy6*. B: A função dos elementos de regulação *cis* nos promotores dos genes *OsWhy2* e *OsWhy6*.

4. CONCLUSÕES

Este estudo traz indícios do envolvimento dos FTs Whirly de arroz em resposta a diferentes estresses, além de evidenciar que os genes estudados apresentam regulação diferencial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. **The Scientific World Journal**, v. 2015, n. 807560, p. 1-17, 2015.
- DESVEAUX, D.; MARÉCHAL, A.; BRISSON, N. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. **TRENDS in Plant Science**, v. 10, n. 2, p. 95-102, 2005.
- ELEC V, QUIMIO CA, MENDOZA R, SAJISE AGC, SARAH, E.J.B.; GLENN B.G. Maintaining elevated Fe²⁺ concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, n. 372, p.253-264, 2013.
- FINATTO, T.; DE OLIVEIRA, A.C.; CHAPARRO, C.; DA MAIA, L.C.; FARIAS, D.R.; WOYANN, L.G.; MISTURA, C.C.; SOARES-BRESOLIN, A.P.; LLAURO, C.; PANAUD, O.; PICAULT, N. Abiotic stress and genome dynamics: specific genes and transposable elements response to iron excess in rice. **Rice**, v.8, n. 13, p. 1-18, 2015.
- JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.345, p. 646-651, 2006.
- MARÉCHAL, A.; JEAN-SÉBASTIEN, P.; SABAR, M.; VÉRONNEAU-LAFORTUNE, F.; ABOU-RACHED, C.; BRISSON, N. Overexpression of mtDNA-associated *AtWhy2* compromises mitochondrial function. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 42, p. 1-15, 2008.
- RAY, S.; DANSANA, P.K.; GIRI, J.; DEVESHWAR, P.; ARORA, R.; AGARWAL, P.; KHURANA, J.P.; KAPOOR, S.; TYAGI, A.K. Modulation of transcription factor and metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice. **Functional and Integrative Genomics**, v. 11, n. 1, p. 157-178, 2011.
- YOSHIDA, S.; FORNO, D.A.; COCK, J.H.; GOMEZ, K.A. Laboratory manual for physiological studies of rice. IRRI, Los Baños, 1976.