

Regulação transcrecional do *OsDREB1D* sob estresses abióticos

JEAN DE OLIVEIRA LOUZADA¹; ALICE PEREIRA DE JESUS²; VÍVIAN EBELING VIANA²; CAMILA PEGORARO²; ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA²; RAILSON SCHREINERT DOS SANTOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – oliveira.louzada506@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – alice.pereira@hotmail.com.br; vih.viana@gmail.com;
pegorarocamilanp@gmail.com; acostol@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – railsons.faem@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Os estresses abióticos são condições ambientais adversas que influenciam negativamente o crescimento e a produtividade das plantas (LATA; PRASAD, 2011). Fatores de transcrição (FTs) da subfamília DREB (*DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING*) são determinantes na regulação de genes induzidos pelos estresses abióticos, incrementando a tolerância das plantas (HUSSAIN et al., 2011). Os FTs DREB são divididos em DREB1 e DREB2, os quais são envolvidos nas respostas ao frio e a seca, respectivamente. Os genes *OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C* e *OsDREB1D* foram os primeiros DREB1 identificados em arroz (revisado em HUANG et al., 2018). O gene *AtDREB1D* é envolvido na via dependente de ABA para resposta ao frio e seca em *Arabidopsis thaliana* (HAAKE et al., 2002; SAKUMA et al., 2002) e seca em soja (GUTTIKONDA et al., 2014). No entanto em arroz, a expressão do gene *OsDREB1D* foi ausente em plantas com 17 dias de vida na condição controle, bem como quando as plantas se encontravam sob os estresses de seca, salinidade, frio e no tratamento com ABA (DUBOUZET et al., 2003). A ausência de expressão do gene *OsDREB1D* deve estar relacionada às propriedades regulatórias em sua região promotora, a qual deve ser analisada com cuidado. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se ilhas CpG são determinantes na baixa taxa transcrecional detectada para o *OsDREB1D* tanto em condições comuns como frente a estresses abióticos.

2. METODOLOGIA

Análise *in silico*

A sequência dos promotores contendo 1Kb foram obtidas no banco de dados *The Rice Annotation Project Database* (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). A análise de ocorrência de ilhas CpG, sítios alvo de modificações epigenéticas, foi realizada *in silico* utilizando o programa *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/methprimer/>) com o objetivo de verificar o possível efeito de modificações epigenéticas na regulação do promotor de *OsDREB1D* (Os06g0165600). Além disso uma análise de elementos de regulação *cis* (CREs) na região flaqueada pelo sítio de restrição foi realizada por meio do *New Place database* (<https://sogo.dna.affrc.go.jp>). A análise de CREs foi também realizada no promotor do gene *OsDREB1C* (Os06g0127100), o qual foi identificado pelo envolvimento em respostas contra diversos estresses como seca, sal, frio e ABA (DUBOUZET et al., 2003).

Um screening foi realizado no promotor do gene *OsDREB1D* a fim de identificar sítios de restrição para a enzima sensível a metilação.

Material Vegetal

Sementes de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*, cultivar Nipponbare) foram esterilizadas em hipoclorito e germinadas em meio de cultura

Murashige e Skoog (MS) adicionado de ácido 1-naftalenoacético por 7 dias a 25°C e posteriormente submetidas ao estresse por temperatura e salinidade. Para a indução dos estresses, o delineamento utilizado compreendeu 3 frascos de meio MS adicionado de 6-benzilaminopurina (BAP) contendo 10 plântulas cada, para cada estresse e condição controle. Para o estresse de frio e calor simulado, os frascos permaneceram por 3 dias em câmara tipo BOD com fotoperíodo 16 horas de luz e temperatura de 13°C e 38°C, respectivamente. Já para o estresse por salinidade, as plântulas foram acondicionadas no meio MS acrescido de BAP e NaCl 50 mM e mantidas em câmara tipo BOD sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas de luz por 3 dias. Para a condição controle (sem estresse), os frascos foram mantidos em câmara tipo BOD em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas de luz por 3 dias. Após este período, a parte aérea das plântulas foram coletadas, congeladas com nitrogênio líquido, e mantidas em -80°C até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA e PCR

A extração foi realizada utilizando o protocolo Doyle e Doyle (1987) com modificações. Para as análises de regulação epigenética, os DNAs foram tratados com a enzima de restrição sensível a metilação *HpaII* (InvitrogenTM) de acordo com as recomendações do fabricante. A fim de verificar as regulações epigenéticas no promotor de gene *OsDREB1D* (Os06g0165600), as quais afetariam a transcrição deste gene, oligonucleotideos foram desenhados no promotor do gene *OsDREB1D* (*pDREB1D*) na região flanqueadora do sitio de restrição da enzima. Uma reação qualitativa em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando a enzima DNA polimerase *Go Taq Green* (PromegaTM) os oligonucleotideos *forward* (CTTCTCATTCGAGCAA) e *reverse* (GATGACAAGTTGAGGGACC), específicos para amplificar o sitio de restrição *HpaII* no *pDREB1D*. Os produtos do PCR foram verificados em eletroforese em gel de agarose 2%. Assim, a regulação epigenética foi analisada de forma que, a presença de bandas indicou que não houve corte da enzima devido a metilação da região e, a ausência de bandas indicou corte da enzima devido a retirada de grupamentos metil na região de restrição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *pOsDREB1D* foi analisando quanto a presença de sítio de restrição para a enzima *HpaII*, a qual é sensível a metilação. Um sítio de restrição foi identificado na região -602 a -495 pbs, indicando que é possível realizar as análises de regulação epigenética no *pOsDREB1D*. Além disso, para verificar se a região -602 a -495 pbs é alvo de regulação epigenética, uma análise *in silico* foi realizada a fim de identificar as possíveis ilhas CpG. As Ilhas CpG estão associadas com a ausência da expressão gênica através da repressão da cromatina na região promotora do gene (CHINNUSAMY; ZHU, 2010). Ilhas CpG foram observadas na região candidata, indicando que há possíveis regiões de modificação epigenética na região alvo de restrição da enzima *HpaII* no *pOsDREB1D* (Figura 1).

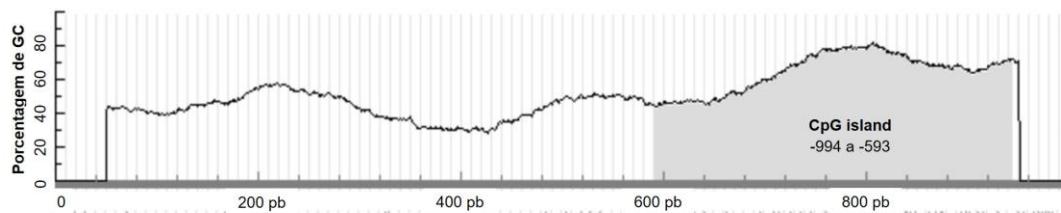


Figura 1: Ilhas CpG no promotor do gene *OsDREB1D*.

Após identificado o sitio de restrição e as possíveis modificações epigenéticas na região -602 a -495 pbs, uma PCR qualitativa foi realizada no DNA digerido com a enzima *HpaII* utilizando os oligonucleotídeos específicos. Os resultados conduzidos em triplicatas, demonstraram que a região -602 a -495 não se apresenta metilada tanto na condição controle quanto nas condições de estresse. Isso porque, foi identificada ausência de bandas indicando a restrição da enzima sensível a metilação, que, no DNA não tratado com a enzima (+C) apresentou banda (Figura 2).

Estes resultados sugerem que, a ausência de expressão do gene *OsDREB1D*, tanto na condição controle como nas condições de estresse, identificado por Dubouzet e colaboradores (2003), não está relacionada a modificações epigenéticas, pelo menos nesta região analisada. Outras 3 regiões vêm sendo testadas para verificar os mecanismos de regulação negativa deste gene.

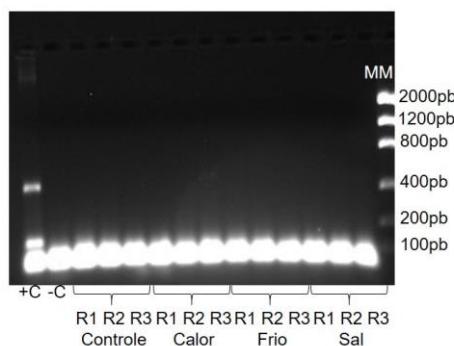


Figura 2: Analise de metilação da região -495 a -602 pbs do promotor do gene *OsDREB1D* na condição controle (sem estresse) e nos estresses por calor, frio e salinidade. MM: Marcador de peso molecular *Low Mass Ladder* (Invitrogen™). +C: controle positivo da reação, DNA não tratado com a enzima de restrição; -C: controle negativo da reação; R1: repetição 1; R2: repetição 2; R3: repetição 3.

Tendo em vista que, pelo menos nessa região, não ocorrem modificações epigenéticas no *pDREB1D*, a causa da regulação negativa pode estar associada constituição da estrutura do promotor. Analises moleculares tem revelado a presença de diversos CREs específicos que intermediam a ativação de vários genes sob diversos estresses abióticos (LATA; PRASAD, 2011). Sendo assim, para verificar o envolvimento da região -602 a -495 pbs na regulação do *pOsDREB1D*, uma análise da presença de CREs foi realizada no *pOsDREB1D* e no *pOsDREB1C*. Foi possível verificar diferenças na constituição de CREs entre os promotores, *pOsDREB1C* apresentou 32 CREs enquanto que *pOsDREB1D* apresentou 14 CREs (Figura 3A).

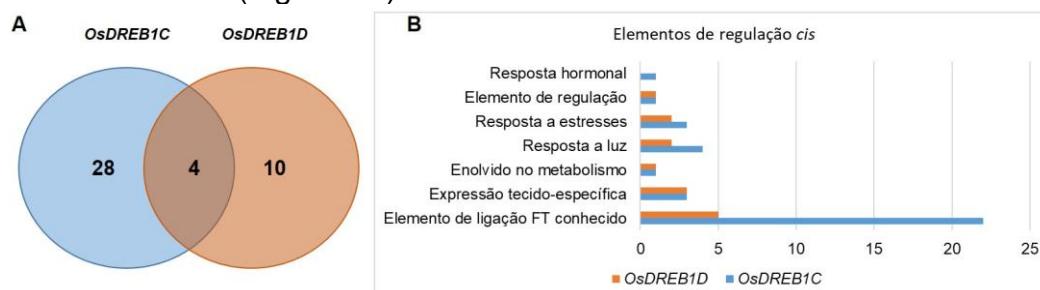


Figura 3: Elementos de regulação *cis* identificados nos promotores dos genes *OsDREB1C* e *OsDREB1D*. **A:** Diagrama de Venn demonstrando o número e o compartilhamento de CREs nos promotores; **B:** Quantidade de CREs nos promotores classificados pela função.

Estes promotores compartilham apenas 4 CREs. Além disso, uma das maiores diferenças encontradas foi a quantidade de elementos de ligação de FTs, pOsDREB1C apresenta 22 elementos de ligação de FTs conhecidos enquanto que pOsDREB1D apresenta apenas 5 (Figura 3B).

Através desses resultados foi possível verificar que a região -602 a -495 pbs do pOsDREB1D não apresenta regulação epigenética quando submetido ao estresse por temperatura e salino. Os resultados apontam ainda que provavelmente a diferença na regulação de pOsDREB1D comparado a genes responsivos a estresses é associada a diferenças na constituição de CREs na região regulatória. Novos estudos vêm sendo conduzido em outras regiões do pOsDREB1D para identificar os mecanismos de regulação negativa deste gene.

4. CONCLUSÕES

Através deste estudo foi possível concluir que a região -602 a -495 pbs do promotor do gene OsDREB1D não apresenta modificação epigenética sendo assim, a ausência de expressão desse gene parece estar associada a estrutura de CREs no promotor deste gene.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.133-139, 2009.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- DUBOUZET, J.G.; SAKUMA, Y.; ITO, Y.; KASUGA, M.; DUBOUZET, E.G.; MIURA, S.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. **The Plant Journal**, v.33, n.4, p.751-63, 2003.
- GUTTIKONDA, S.K.; VALLIYODAN, B.; NEELAKANDAN, A.K.; TRAN, L.S.P.; KUMAR, R.; QUACH, T.N.; VOOTHULURU, P.; GUTIERREZ-GONZALEZ, J.J.; ALDRICH, D.L.; PALLARDY, S.G.; SHARP, R.E.; HO, T.H.D.; NGUYEN, H.T. Overexpression of AtDREB1D transcription factor improves drought tolerance in soybean. **Molecular Biology Reporter**, v.41, p.7995-8008, 2014.
- HAAKE, V.; COOK, D.; RIECHMANN, J.L.; PINEDA, O.; THOMASHOW, M.F.; ZHANG, J.Z. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.130, p.639-648, 2002.
- HUANG, L.; WANG, Y.; WANG, W.; ZHAO, X.; QIN, Q.; SUN, F.; HU, F.; ZHAO, Y.; LI, Z.; FU, B.; LI, Z. Characterization of Transcription Factor Gene OsDRAP1 Conferring Drought Tolerance in Rice. **Frontiers in Plant Science**, v.9, n.94, p.1-15, 2018.
- HUSSAIN, S.S.; KAYANI, M.A.; AMJAD, M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought tolerance in plants. **Biotechnology Progress**, v.27, n.2, p.297-306, 2011.
- LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.14, p.4731-4748, 2011.
- SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 290, p.998-1009, 2002.