

## Regulação transcricional do *OsDREB1D* sob estresses abióticos

JEAN DE OLIVEIRA LOUZADA<sup>1</sup>; ALICE PEREIRA DE JESUS<sup>2</sup>; VÍVIAN  
EBELING VIANA<sup>2</sup>; CAMILA PEGORARO<sup>2</sup>; ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA<sup>2</sup>;  
RAILSON SCHREINERT DOS SANTOS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [oliveira.louzada506@hotmail.com](mailto:oliveira.louzada506@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [alice.pereira@hotmail.com.br](mailto:alice.pereira@hotmail.com.br); [vih.viana@gmail.com](mailto:vih.viana@gmail.com);  
[pegorarocamilanp@gmail.com](mailto:pegorarocamilanp@gmail.com); [acostol@gmail.com](mailto:acostol@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [railsons.faem@ufpel.edu.br](mailto: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 transcricional 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. *japônica*, 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* (Invitrogen™) 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, oligonucleotídeos foram desenhados no promotor do gene *OsDREB1D* (*pDREB1D*) na região flanqueadora do sítio de restrição da enzima. Uma reação qualitativa em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando a enzima DNA polimerase *Go Taq Green* (Promega™) os oligonucleotídeos *forward* (CTTCTCATTTCGCAGCAA) e *reverse* (GATGACAAGTTGAGGGACC), específicos para amplificar o sítio 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).

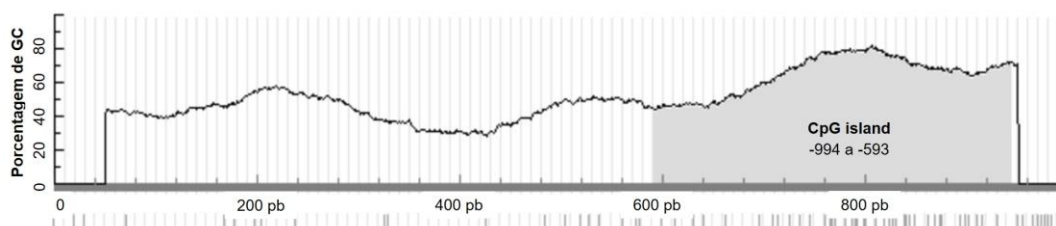
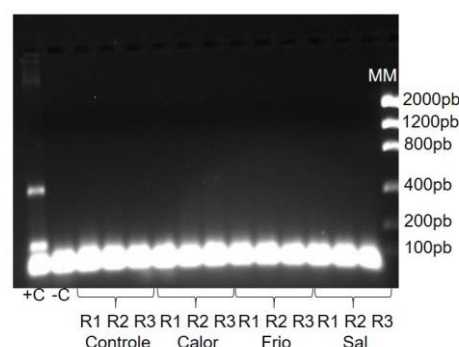


Figura 1: Ilhas CpG no promotor do gene *OsDREB1D*.

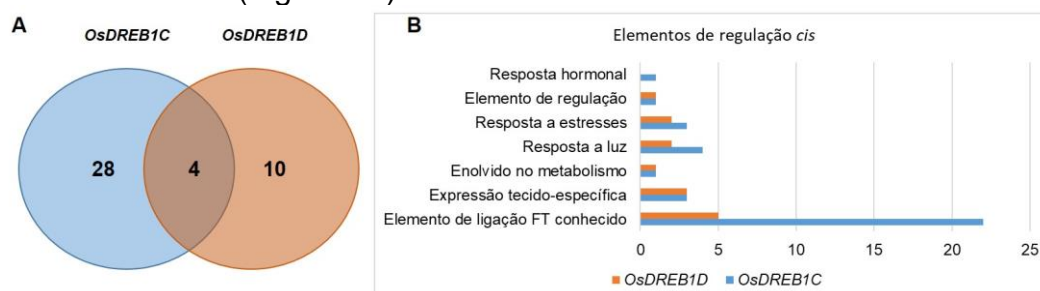
Após identificado o sítio de restrição e as possíveis modificações epigenéticas na região -602 a -495 pbs, uma PCR qualitativa foi realizada no DNA digerido com a enzima *HpaII* utilizando os oligonucleotídeos específicos. Os resultados conduzidos em triplicatas, demonstraram que a região -602 a -495 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:** Análise 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. Análises 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.