

REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE GENES *WHIRLY* EM ARROZ

STEFÂNIA GARCIA ZENKER¹; KARINE ELISE JANNER²; VIVIAN EBELING
VIANA³; CAMILA PEGORARO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – ste_garcia_zenker@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – karinejanner@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – vih.viana@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas alimentares consumida no mundo, fazendo parte da dieta diária de quase metade da população mundial. No entanto, a produtividade de arroz é afetada por vários estresses bióticos e abióticos. Os estresses abióticos que afetam a produtividade de arroz incluem seca, salinidade, altas e baixas temperaturas, radiação ultravioleta, etc (RAHMAN et al. 2019). Para evitar perdas de produtividade nessas condições é necessário o desenvolvimento de cultivares tolerantes. No entanto, sabe-se que o arroz cultivado apresenta base genética estreita devido a forte pressão de seleção para caracteres de interesse agrônômico (VENSKE et al., 2018). Dessa forma, a identificação de genes envolvidos em mecanismos de tolerância nas espécies selvagens do gênero *Oryza* e sua introdução em arroz cultivado é uma estratégia de ampliação da variabilidade genética.

As plantas de arroz respondem ao estresse ativando inúmeras vias de sinalização. Diferentes genes são induzidos ou reprimidos promovendo tolerância a condição estressante (RAHMAN et al. 2019). A regulação da transcrição envolve a ligação de fatores de transcrição (FTs) em elementos de regulação *cis* (CREs) presentes na região promotora de genes específicos (KAUR et al. 2017). A sinalização em condição de estresse abiótico pode ser dependente de ácido abscísico (ABA), através da atuação dos FTs AREB/ABF (proteína de ligação a ABRE/fator de ligação a ABRE), MYB (myeloblastosis), MYC (myelocytomatosis) e WRKYs, ou independente de ABA, pela ação do FT DREB/CBF (proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação/fator de ligação à repetição C) (SINGH e LAXMI, 2015).

Os FTs têm sido considerados um excelente alvo para manipulação via transgenia visando tolerância das plantas a estresses abióticos. A vantagem do uso de FTs deve-se ao fato que a tolerância ao estresse é determinada por múltiplos genes, assim, o uso de um gene funcional que codifica um único produto em particular parece ser menos eficaz do que o uso de um gene que codifica um FT que regula vários genes funcionais e reguladores (HOANG et al. 2017). Para isso, a elucidação da regulação transcrricional de FTs é uma etapa crucial no entendimento do mecanismo molecular de resposta a estresses abióticos em plantas.

Diferentes famílias de FTs que regulam a resposta a estresses abióticos têm sido identificadas e seus mecanismos de regulação foram elucidados (HOANG et al. 2017). A família de FTs *Whirly* foi caracterizada por atuar na sinalização em resposta a estresses bióticos (DESVEAUX et al. 2005). No entanto, a sua participação em resposta a estresses abióticos ainda não foi esclarecida. Dessa forma, este estudo teve por objetivo a caracterização de promotores de genes *Whirly* no gênero *Oryza* quanto à sinalização pelas vias dependente e independente de ABA em resposta a estresses abióticos.

2. METODOLOGIA

Genes da família *Whirly* (*Why*) foram inicialmente obtidos no banco de dados *The Rice Annotation Project Database* (RAP-DB) no genoma de *Oryza sativa* ssp. *japonica*. Posteriormente, as sequências foram utilizadas para identificação dos genes *Why* nas demais espécies do gênero *Oryza* (*O. sativa* ssp. *indica*; *O. rufipogon*; *O. punctata*; *O. nivara*; *O. meridionalis*; *O. glumaepatula*; *O. glaberrima*; *O. brachyantha* e *O. barthii* no banco de dados da *Ensembl Plants*. Em seguida, a região promotora predita (1,5kb *upstream* do sítio de início da transcrição) foi obtida. Os promotores preditos foram analisados quanto a presença de elementos de regulação *cis* (CREs) no banco de dados *New PLACE* (*A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements*) (HIGO et al., 1999).

Foi construída uma figura com os CREs alvos de FTs associados com a via dependente de ABA e independente de ABA buscando verificar a participação desse fitohormônio na sinalização dos genes *Why*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compreender o mecanismo de regulação gênica associada a estresses é uma estratégia na identificação de genes candidatos para o melhoramento, visando tolerância a condições ambientais adversas. A busca dos genes *Whirly* (*Why*) nas espécies do gênero *Oryza* foi realizada com base em *Why2* e *Why6* identificados em *Oryza sativa japonica*. Nesta espécie, os genes *Why* estão localizados nos cromossomos 2 e 6, assim como para a maioria das espécies do gênero. No entanto, a espécie *O. glumaepatula* apresentou apenas um gene *Why* no cromossomo 2, e em *O. meridionalis* observou-se a presença de dois genes *Why*, porém localizados nos cromossomos 6 e 7.

Com base na estrutura dos promotores preditos dos genes *Whirly* verificou-se que estes são regulados para atuar na resposta a estresses abióticos. Além disso, esses genes são regulados por vias dependentes e independentes de ácido abscísico (ABA), e esse comportamento é mantido em todas as espécies de *Oryza* analisadas (Figura 1).

Dois elementos de regulação *cis* (CREs), sítios de ligação de fatores de transcrição (FT) DREB/CBF, foram comuns para os dois genes *Why* e se mantiveram conservados na grande maioria das espécies (Figura 1). Em *Arabidopsis thaliana* a superexpressão de *AtDREB1/CBF* leva a tolerância a frio, seca e alta salinidade, sugerindo que esse FT tem como alvo genes candidatos associados com a tolerância aos estresses (revisado por KIMOTHO et al., 2019). Dentro dessa perspectiva, os resultados obtidos demonstram que os genes *Why* podem estar envolvidos na resposta a estresses nas espécies do gênero *Oryza*, já que são alvos de DREBs.

O ABA é conhecido como o fitohormônio do estresse e participa na resposta adaptativa de estresses bióticos e abióticos, atuando na ativação de FTs AREB/ABF (LIU et al., 2019). Apenas um CRE reconhecido por AREB/ABF foi comum em todas as espécies para os dois genes, enquanto outros quatro CREs tiveram ocorrência reduzida nos promotores (Figura 1). Dessa forma, acredita-se que os genes *Why* também são regulados por AREB/ABF sob condição de estresse.

Os FTs MYB e MYC são sinalizados por ABA, e assim como os AREB/ABF ativam genes funcionais envolvidos na resposta a estresses abióticos (revisado por KIMOTHO et al., 2019). Quatro sítios de ligação de MYB foram comuns entre

as espécies. Por outro lado, CREs alvos de MYCs ocorreram em menor frequência, com apenas um elemento presente em todos os promotores analisados (Figura 1). Esse resultado é mais uma evidência do envolvimento dos genes *Why* na resposta a estresses, uma vez que são sinalizados pelos FTs MYB e MYC.

Sinalização	FTs	CRE	ABA Dependente																	
			Osp1Yn2	Osp1Yn3	Osp1Yn4	Osp1Yn5	Osp1Yn6	Osp1Yn7	Osp1Yn8	Osp1Yn9	Osp1Yn10	Osp1Yn11	Osp1Yn12	Osp1Yn13	Osp1Yn14	Osp1Yn15	Osp1Yn16	Osp1Yn17	Osp1Yn18	
ABA Independente	DREB/CBF	DRE2COREZMRAB17	1	0	2	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
		DRECRTCOREAT	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
		CBFHV	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	0	3	1
		CRTRDHVCBF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0
		LTRE1HVBTL49	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		LTRECOREATCOR15	1	3	2	3	2	3	1	1	2	3	3	0	1	1	3	0	1	3
		ABRELATERD1	2	0	2	0	2	0	4	0	2	0	2	1	2	16	0	0	3	2
AREB/ABF	ABREOSRAB21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	ABRERATCAL	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
	ACGTABREMOTIFA2OSEM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	DPBFCOREDCDC3	3	2	2	3	2	3	5	2	2	4	1	2	1	1	2	3	3	1	2
MYB	MYB1AT	5	2	3	2	3	2	2	2	4	2	3	3	4	4	2	4	2	5	2
	EECCRAH1	1	3	1	4	1	3	2	4	1	3	4	1	1	1	3	3	1	1	3
	IBOX	3	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	1	0	3	2	0	0
	L1BOXATPDF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	MYB1LEPR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	MYB2CONSENSUSAT	4	5	5	2	5	4	5	2	4	6	4	1	4	5	4	2	3	5	5
	MYBATRD22	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	MYBCORE	8	7	9	4	10	9	10	3	8	8	6	3	8	10	7	8	5	10	7
	MYBCOREATCYCB1	0	4	0	2	0	4	0	3	0	9	4	2	0	0	4	0	3	0	4
	MYBPZM	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2	2	0	0
	MYBST1	0	5	0	5	0	5	1	5	0	5	5	2	0	0	5	3	4	0	5
	TATCCAOSAMY	0	2	0	1	0	2	0	4	0	2	1	0	0	0	1	2	1	0	2
	MYC	T/GBXATPIN2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
BP5OSWX		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
MYCATERD1		1	1	0	1	0	2	1	0	1	4	0	0	0	0	2	3	1	0	2
MYCCONSENSUSAT		16	6	14	8	14	8	16	4	16	14	8	12	12	14	6	16	10	14	4
WRKY	WBBOXPCWRKY1	1	1	1	1	1	1	0	0	2	2	1	0	1	1	1	1	0	1	1
	WBOXATNPR1	4	6	3	4	3	5	2	2	4	8	4	3	3	6	3	2	3	6	6
	WBOXH/ISO1	1	5	2	5	1	5	1	3	1	6	4	3	2	2	5	5	0	2	5
	WBOXNTCHN48	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	0	0	1	2
	WBOXNTERF3	3	7	4	7	4	7	2	4	4	9	6	7	4	4	7	5	2	4	8
	WRKY71OS	0	12	12	9	13	0	7	6	12	13	11	14	14	13	12	10	7	13	13
	WRKY71OS 12	12	0	0	0	0	12	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ELRECOREPCRP1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	3	1	1	0	0	1	1	1	

Figura 1: Ocorrência de elementos de regulação *cis* (CRE) nos promotores preditos dos genes *Whirly* alvos de fatores de transcrição (FTs) sinalizados via dependente e independente de ácido abscísico (ABA) nas espécies do gênero *Oryza*. Osjap: *Oryza sativa* ssp. *japonica*; Osind: *O. sativa* ssp. *indica*; Oruf: *O. rufipogon*; Opun: *O. punctata*; Oniv: *O. nivara*; Omer: *O. meridionalis*; Oglu: *O. glumaepatula*; Ogla: *O. glaberrima*; Obra: *O. brachyantha*; Obar: *O. barthii*.

Os FTs WRKY desempenham um papel essencial na regulação de respostas aos estresses bióticos e abióticos em plantas. Já foi reportado o envolvimento de WRKYs na sinalização celular durante os estresses ocasionados por salinidade, seca, calor, frio, submergência, entre outras condições adversas (revisado por VIANA et al., 2018). Os genes *Why* apresentaram grandes quantidades de CREs alvos de WRKYs nas espécies analisadas (Figura 1), indicando que são regulados preferencialmente por esses FTs. Esse resultado coloca os genes *Why* entre os potenciais candidatos para tolerância a estresses.

4. CONCLUSÕES

Os genes *Why* parecem estar envolvidos na resposta a diferentes estresses nas espécies do gênero *Oryza* através da sinalização dependente e independente de ABA. Esses genes podem ser utilizados no melhoramento de arroz para tolerância a condições ambientais adversas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESVEAUX, D., MARÉCHAL, A., BRISSON, N. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. **TRENDS in Plant Science** v.10 n.2 Fevereiro, 2005.

KAUR, A., PATI, P. K., PATI, A. M., NAGPAL, A. K. *In-silico* analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. **PLOS ONE**, v.14, 2017.

RAHMAN, M. UR., MUNAZZAIJAZ, QAMAR, S., BUKHARI, S. A., MALIK, K. Abiotic Stress Signaling in Rice Crop. In: **Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance**. p. 551-569, 2019.

HOANG, X. L. T., NHI, D. N. H., THU, N. B. A., THAO, N. P., TRAN, L. S. P. Transcription Factors and Their Roles in Signal Transduction in Plants under Abiotic Stresses. **Curr Genomics**. v.18(6): p.483–497, 2017.

SINGH, D., LAXMI, A. Transcriptional regulation of drought response : a tortuous network of transcriptional factors. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. October, p. 1–11, 2015.

HIGO, K., UGAWA, Y., IWAMOTO, M., KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 297–300, 1999.

KIMOTHU, R. N., BAILLO, E. H., ZHANG, Z. Transcription factors involved in abiotic stress responses in maize (*Zea mays* L.) and their roles in enhanced productivity in the post genomics era. **PeerJ Preprints**. 2019.

LIU, T., ZHOU, T., LIAN, M., LIU, T., HOU, J., IJAZ, R., SONG, B. Genome-Wide Identification and Characterization of the AREB/ABF/ABI5 Subfamily Members from *Solanum tuberosum*. **Int. J. Mol. Sci.**, 20, 311, 2019.

VENSKE, E., STAFEN, C. F., OLIVEIRA, V. F., JUNIOR, L. C. M. A. M. M., MCNALLY, K. L., OLIVEIRA, A. C., PEGORARO, C. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and population structure in a panel of Brazilian rice accessions **Journal of Applied Genetics**. 2018.