

VARIABILIDADE GENÉTICA DOS GENES *WHIRLY* EM ESPÉCIES DO GÊNERO *ORYZA*

STEFÂNIA GARCIA ZENKER¹; KARINE ELISE JANNER DE FREITAS²; VÍVIAN EBELING VIANA³; VIVIANE KOPP DA LUZ⁴; CAMILA PEGORARO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – stefaniazenker@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – karinejanner@gmail.com

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

⁴Universidade Federal de Pelotas – vivikp05@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais consumidos no mundo e serve de fonte de alimento para milhões de pessoas. Porém, a produtividade do grão é prejudicada devido a alterações ambientais desfavoráveis (RAHMAN et al., 2019). Nesse sentido, o desenvolvimento de genótipos tolerantes a estresses abióticos é uma importante estratégia para garantir a produtividade.

No entanto, o desenvolvimento de genótipos tolerantes a estresses depende da variabilidade genética existente entre os acessos. Porém, tem sido detectado um estreitamento da variabilidade genética dentro da espécie *O. sativa* (BUSANELLO et al., 2020). Dessa forma, explorar espécies selvagens como fonte de variabilidade tem sido uma estratégia nos programas de melhoramento (RAM et al., 2007). Alguns genes importantes já foram transferidos de espécies selvagens para os genótipos modernos (HEDDEN, 2003; HOISINGTON et al., 1999; MANJUNATHA e KRISHNAPPA, 2019), mostrando a viabilidade dessa estratégia.

Sendo assim, a identificação de genes que estão associados com a tolerância aos estresses é uma abordagem importante para auxiliar os melhoristas na obtenção de genótipos tolerantes. Várias famílias de fatores de transcrição (FTs), como bZIPs, WRKYs, CBFs, DREBs e demais ERFs, estão envolvidos na sinalização inicial em resposta a estresses. A família de fatores de transcrição *WHIRLY*, caracterizada inicialmente pelo envolvimento na resposta a estresses bióticos, é pouco estudada, e tem se mostrado forte candidata para pesquisas relacionadas a tolerância a estresses abióticos (DESVEAUX, et al., 2005). Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar o perfil evolutivo de genes *Whirly* (*Why*) em espécies do gênero *Oryza* buscando detectar variabilidade genética para futura utilização em *O. sativa*.

2. METODOLOGIA

Os genes *Whirly* de *O. sativa* ssp. *japonica* foram obtidos no banco de dados RAP-DB (*The Rice Annotation Project Database* - <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>). Genes homólogos nas demais espécies do gênero *Oryza* e *Leersia perrieri*, assim como as sequências proteicas, foram obtidos através da ferramenta BLAST, disponível no banco de dados ENSEMBL PLANTS (<http://plants.ensembl.org/index.html>). As proteínas codificadas pelos genes *Whirly* (*Why2* e *Why6*) selecionados em cada uma das 11 espécies foram submetidos a um alinhamento global com o software MEGA7 através da ferramenta *Clustal W* (LARKIN et al., 2007; KUMAR et al., 2016) e posteriormente foi gerado uma árvore filogenética. Através do pacote *BEAST* (DRUMMOND e RAMBAUT, 2007) o modelo apropriado foi selecionado para uso na análise

Bayesiana com 1.000.000 de réplicas de *bootstrap*. A espécie *L. perrieri* foi escolhida como *outgroup*. OsJAP se refere a *O. sativa japonica*; OsIND - *O. sativa indica*; ORUF - *O. rufipogon*; ONIV - *O. nivara*; OGLU - *O. glumaepatula*; OGLA - *O. glaberrima*; OBAR - *O. barthii*; OMER - *O. meridionalis*; OPUN - *O. punctata*; OBRA - *O. brachyantha*; OLON - *O. longistaminata*; e LPER - *L. Perrieri*.

A estrutura dos genes *Why* em cada espécie foi obtida no ENSEMBL PLANTS. A identificação dos motivos das proteínas WHY foi feita utilizando *Multiple Motif In Elicitation* versão 4.11.1 (MEME; <http://meme-suite.org/tools/meme>) (BAILEY et al., 2009), sendo estabelecido como 10 o número máximo de motivos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, um total de 24 sequências correspondentes aos genes *Why* localizados no cromossomo 2 e 6, foram identificados nas espécies de *Oryza*. Todas as espécies analisadas apresentaram uma cópia correspondente a *Why2* e uma cópia correspondente a *Why6*, mantendo a localização nos cromossomos 2 e 6, respectivamente. A manutenção de *Why2* e *Why6* nos diferentes genomas ao longo da evolução demonstra a importância desses FTs no gênero *Oryza*.

A árvore filogenética (Figura 1A) mostra que as sequências proteicas são distintas. A proteína codificada pelo gene *Why2* de *O. brachyantha* é a mais distante, seguido das proteínas WHY2 de *O. punctata* e *L. perrieri* (*outgroup*), que também se distanciam das demais espécies. De maneira geral, proteínas WHY2 de diferentes espécies são mais similares entre si do que com proteínas WHY6 dentro da mesma espécie, o que também é observado para WHY6. Esse perfil demonstra que para a maioria das espécies os genes *Why2* e *Why6* acumularam mutações nas sequências e estrutura gênica (Figura 1B) e por isso, as proteínas codificadas por eles apresentam diferenças. Essas mudanças são importantes para a evolução, pois genes similares como *Why2* e *Why6* podem apresentar funções distintas, que podem ocasionar mudanças no fenótipo e interação com ambiente (BARTLETT e WHIPPLE, 2013). Com relação ao tamanho do gene, verifica-se que, de maneira geral, *Why6* é menor que *Why2* devido a ausência de dois exons (Figura 1B).

O. punctata poderia ser utilizada como fonte de variabilidade para *Why2*. Da mesma forma, *O. brachyantha* também é uma possível fonte de variabilidade entre as espécies do gênero *Oryza* para o gene *Why2*, e essa variabilidade é devida a um grande éxon na porção inicial do gene (Figura 1B). *O. meridionalis* também apresenta um éxon grande na região 5' de *Why2*, diferindo das outras espécies (Figura 1B), porém, apresenta apenas dois dos nove motivos encontrados nas demais espécies (Figura 1C), o que sugere a perda/alteração de função desse gene.

De modo interessante *Why6* de *O. glumaepatula* apresenta um longo íntron em sua estrutura, que não é encontrado nas outras espécies analisadas (Figura 1B), o que poderia ser uma importante fonte de variabilidade considerando eventos de *splicing* alternativo e regulação gênica (JO e CHOI, 2015). Porém, a sua estrutura proteica apresenta apenas um motivo (Figura 1C), sugerindo ausência de função. Neste estudo, verificou-se que os genes com maior tamanho (*Why2* de *O. meridionalis* e *Why6* de *O. glumaepatula*) codificaram proteínas aparentemente sem função.

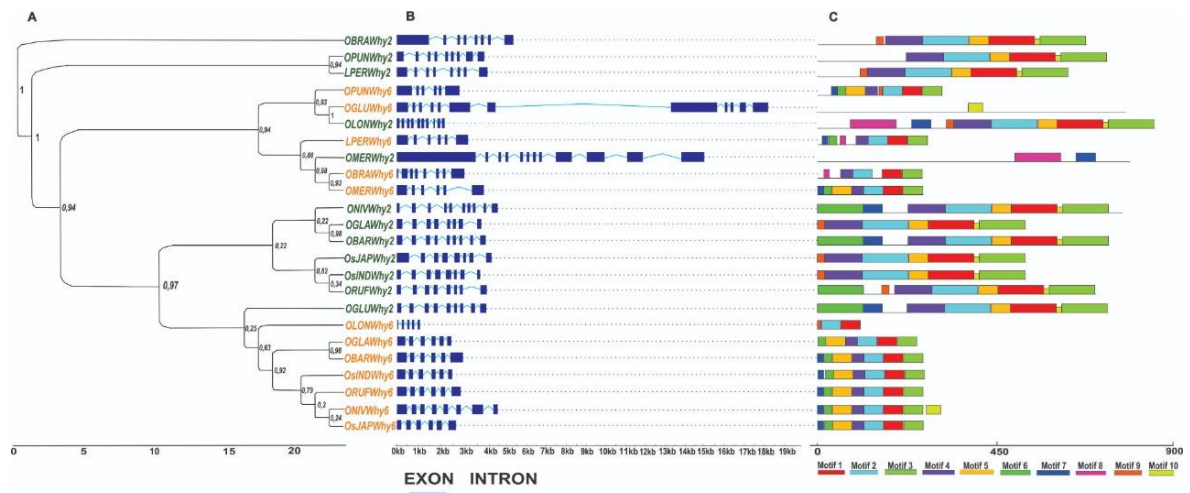


Figura 1: Relação filogenética, estrutura dos genes e análise dos motivos conservados nas proteínas Whirly em *Oryza*. **A.** Árvore filogenética construída a partir da sequência das proteínas codificadas pelos genes *Why6* (laranja) e *Why2* (verde). **B.** Estrutura éxons-íntrons dos genes *Why* em *Oryza* e *Leersia*. Os blocos azuis representam os exons e as linhas azul claro representam os íntrons. **C.** Identificação de motivos proteicos, que são indicados em diferentes cores. A variação dos motivos ocorre de 1 a 10.

4. CONCLUSÕES

Os genes *Why* apresentam variações estruturais entre as diferentes espécies do gênero *Oryza*. Essas variações precisam ser melhor avaliadas, pois podem ser fonte de variabilidade genética para uso em programas de melhoramento para tolerância a estresses em arroz.

4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, T. L.; BODEN, M.; BUSKE, F. A.; FRITH, M.; GRANT, C. E.; CLEMENTI, L. REN, J.; LI, W. W.; NOBLE, W. S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Research**, v.37, p. W202-W208, 2009.
- BARTLETT, M. E.; WHIPPLE, C. J. Protein change in plant evolution: tracing one thread connecting molecular and phenotypic diversity. **Frontiers in Plant Science**, v.4, 2013.
- BUSANELLO, C.; VENSKE, E.; STAFEN, C. F.; PEDROLO, A. M.; LUZ, V. K.; PEDRON, T.; PANIZ, F. P.; BATISTA, B. L.; JUNIOR, A. M. M.; OLIVEIRA, A. C.; PEGORARO, C. Is the genetic variability of the Southern Brazilian elite rice becoming really exhausted?. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.20, p. e2626202, 2020.
- DESVEAUX, D.; MARÉCHAL, A.; BRISSON, N. Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. **Trends Plant Science**. v.10, p.95-102, 2005.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, p.214, 2007.
- HEDDEN, P. The genes os the Green Revolution. **Trends in Genetics**, v.19, n.1, p.5-9, 2003.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; REEVES, T.; RIBAUT, J. M.; SKOVMAND, B.; TABA, S.; WARBURTON, M. Plant genetic resources: What can they contribute toward increased crop productivity?. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.96, n.11, p.5937-5943, 1999.
- JO, B. S.; CHOI, S. S. Introns: The Functional Benefits on Introns in Genomes. **Genomics e Informatics**, v.13, n.4, p.112-118, 2015.
- KUMAR, S.; TECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n.7, p.1870-1874, 2016.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0, **Bioinformatics**, v.23, n.21, p.2947-2948, 2007.
- MANJUNATHA, B.; KRISHNAPPA, M. Genetic variability, blast reaction sudeis and identification of blast tolerant lines in elite genotypes of rice. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n. 3, p. 726-729, 2019.
- 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.
- RAM, T.; MAJUMDER, N. D.; MISHRA, B.; ANSARI, M. M.; PADMAVATHI, G. Introgression of broad-spectrum blast resistance gene(s) into cultivated rice (*Oryza sativa* ssp *indica*) from wild rice *O. rufipogon*. **Current Science**, v.92, n.2, p. 225-230, 2007.