

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *HSFA4D* DE ARROZ

Victoria Freitas de Oliveira¹, Vívian Ebeling Viana², Luciana Dallegrave Schroeder³, Marcia Maria Auxiliadora Pinheiro Margis⁴, Antonio Costa de Oliveira⁵, Camila Pegoraro⁶

Palavras chave: *Oryza sativa*, frio, fator de transcrição, transformação genética.

INTRODUÇÃO

A produtividade agrícola aumentou significativamente nos últimos anos, porém ainda é insuficiente para suprir a demanda da população em crescimento e é dependente das condições ambientais, as quais são alvo das mudanças climáticas globais. Esse cenário é observado em todas as espécies cultivadas, incluindo o arroz (*Oryza sativa* L.) o qual serve como alimento básico para mais da metade da população mundial, sendo considerado a fonte mais importante de nutrientes para bilhões de pessoas (Mataveli et al., 2016). Estresse causado por frio pode afetar negativamente qualquer estágio de desenvolvimento do arroz. Durante o estágio inicial provoca atraso e redução na taxa de germinação, resultando no aumento da competição de plantas invasoras e redução de até 25% do rendimento final. No estágio vegetativo pode afetar o estabelecimento das plântulas, levar ao amarelecimento das folhas, crescimento tardio e diminuição do afilhamento. Quando o frio ocorre no estágio reprodutivo pode afetar a qualidade de grão e diminuir a produtividade (revisado por Menguer et al., 2017).

Algumas espécies/genótipos de plantas apresentam tolerância ao frio em grau variável, o que depende da reprogramação da expressão gênica para modificar sua fisiologia, metabolismo e crescimento. Dentre os produtos gênicos de resposta a estresse pode-se destacar os fatores de transcrição (FTs), que apresentam papel essencial na regulação da resposta da planta em condições de estresse, através da ligação em elementos *cis* presentes na região promotora e genes alvo (Kim et al., 2016). Uma classe de FTs que tem papel vital na resposta a estresses abióticos são os Fatores de Choque de Calor (*Heat shock factor* - HSFs). Estudos recentes têm identificado a associação de diferentes HSFs com a tolerância a estresses abióticos como calor, estresse oxidativo e frio e estresses bióticos (Jin et al., 2013). Em arroz existem 25 membros da família HSF (Guo et al., 2008), e existe uma grande diversidade na função desses FTs, sendo necessário investigar o papel de cada um sob diferentes condições de estresse. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo caracterizar o gene *HSFA4D*, um candidato para tolerância a estresse por frio em arroz.

METODOLOGIA

Um grupo de plantas de *O. sativa* cv. Nipponbare previamente transformadas com o gene *HSFA4D* (*Os05g0530400*) (Pegoraro, 2012) foi caracterizado quanto à presença da construção de interesse (*Ubi::HSFA4D*) e ao acúmulo de transcritos do gene *HSFA4D*. Para amplificação de um fragmento da construção *Ubi::HSFA4D* utilizou-se DNA de cada uma das linhagens em T1 e os oligonucleotídeos F- CGCTTTCCTTCCTC; R- AACATTCCTGAGTAAAAGAGGTG. A extração de DNA foi feita de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1967). O perfil de expressão do gene *HSFA4D* foi analisado a partir do cDNA de cada uma das linhagens em T1 utilizando os oligonucleotídeos F- CACCTCTTGATTCATCGTGGCT; R – AACATTCCTGAGTAAAAGAGGTG. A extração de RNA foi feita de acordo com protocolo descrito por Zeng e Yang (2002). A síntese de cDNA

¹ Eng^a. Agrônoma. Universidade Federal de Pelotas. Avenida Eliseu Maciel - 3º andar da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Estrada Corredor da Embrapa. 96160-000 - Capão do Leão, RS - Brasil - e-mail. vicdeol@gmail.com.

² MSc. em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas.

³ Estudante de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

⁴ PhD em Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵ PhD. em Genética. Universidade Federal de Pelotas.

⁶ Dra. em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas.

foi feita utilizando o kit SuperScript III® First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para identificação de elementos *cis* na região promotora (1 kb *upstream* – RAP-DB <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html>) do gene *Os05g0530400* (HSFA4D) utilizou-se o programa PLANTCIS (http://www.microsatellite.org/cis_input.html). Apenas elementos com p-value $\leq 0,05$ foram considerados. Dois genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), C418 sensível ao frio e K354 tolerante ao frio, foram caracterizados quanto à expressão gênica em condições de frio. Foram utilizadas plântulas em estágio de três folhas, cultivadas em câmara de crescimento com 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com umidade relativa de 75-80% e 25°C. Para a condição controle as plântulas permaneceram conforme descrito acima, e para condição de estresse por frio, as plântulas foram transferidas para câmara a 4°C durante 48 horas. A análise de expressão gênica foi realizada utilizando a técnica de microarranjos (*Affymetrix rice microarray platform*). Os dados obtidos (GSE37940) foram depositados no Banco de Dados Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/index.jsp>). Nesse estudo utilizaram-se dados de expressão para os genes *WRKY71* (*Os02g0181300*) e *HSFA4D*, com p-value $\leq 0,01$, provenientes do Banco Genevestigator.

Ainda, um teste simples de germinação foi realizado. Sementes das linhagens transformadas bem como sementes do genótipo selvagem Nipponbare, foram submetidas a germinação sob estresse por frio em temperatura de 13°C e como controle, germinação a temperatura de 25°C, ambos em câmara BOD. A germinação foi avaliada sete e 14 dias após a semeadura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de realizar a genotipagem das plantas possivelmente transformadas com a construção *Ubi::HSF4D*, o DNA genômico foi extraído e submetido a uma reação de PCR com oligonucleotídeos específicos. É possível verificar na figura 1A que as linhagens analisadas possuem a inserção da construção pela presença de bandas no tamanho esperado (751pb), apenas a planta 5 da linha 10 e as plantas 1 e 2 da linha 1 não apresentaram banda específica sendo consideradas selvagens. O genótipo selvagem foi utilizado como controle e apresentou uma banda de tamanho diferente e pouco visível, provavelmente fruto de alguma amplificação espúria. Os resultados obtidos na análise são confiáveis quando se verifica a ausência de bandas no controle negativo. Foi analisado também a abundância de transcritos nas linhagens transformadas através de uma PCR utilizando oligonucleotídeos específicos no cDNA obtido através da transcrição reversa do RNA total extraído. A figura 1B demonstra a abundância de transcritos através da presença de bandas de tamanho esperado (177pb). Pode-se observar pelos resultados preliminares utilizando PCR qualitativo que não houve co-supressão do gene, visto que os genótipos transformados produziram transcritos. Uma análise precisa da expressão relativa dos transcritos será realizada por qRT-PCR.

Para avaliar a regulação do gene *HSFA4D* analisou-se a presença de elementos *cis* na sua região promotora (1 kb *upstream*). Foram identificados 12 CRÉs diferentes, os quais apresentaram uma ocorrência de 40 vezes (Tabela 1). Dentre as sequências reguladoras identificadas pode-se destacar WBBOXPCWRKY1, a qual é identificada e ligada por fatores de transcrição da família WRKY (Tiwari et al., 2013). Além disso, também merece destaque o elemento LTRE1HVBLT49, responsivo a baixas temperaturas (Dunn et al., 1998). Em um estudo desenvolvido por Kim et al. (2016) foi observado que a superexpressão de *WRKY71* em arroz resultou em plantas tolerantes ao frio. Dessa forma, sugere-se que *HSFA4D* pode ser regulado por *WRKY71* e estar associado à tolerância ao frio. Esta hipótese é reforçada pela presença de um elemento responsivo ao frio na região promotora de *HSFA4D*. Além disso, o perfil de expressão de *WRKY71* e *HSFA4D* em plantas de arroz submetidas ao frio (Figura 2) demonstra que ambos os genes respondem ao estresse, sendo mais um indicativo de que esses FTs podem apresentar uma associação. Verificou-se porém, que ocorre indução da expressão dos genes em resposta ao frio independente do genótipo (tolerante ou suscetível). Esse comportamento indica que a resposta ao frio é coordenada

por uma rede gênica, que vai além de *WRKY71* e *HSFA4D*, mas que esses genes têm um papel chave na resposta ao estresse.

Sabendo do envolvimento do gene *HSFA4D* em resposta ao estresse por frio, sementes provenientes das plantas transformadas T1 juntamente com sementes do genótipo selvagem Nipponbare, foram submetidas ao teste simples de germinação no frio. Através desse ensaio é possível observar na Tabela 2 que as linhagens transformadas possuem tolerância à germinação ao frio. Primeiramente, o vigor das sementes é observado na germinação em condição controle onde todos os genótipos estudados apresentaram 100% de germinação em até sete dias. As linhas 7, 10, 11 e 12 demonstraram 100% de germinação em sete dias sob estresse por frio enquanto que a cultivar Nipponbare apresentou apenas 50%. Mesmo avaliada em 14 dias a cultivar Nipponbare apresentou apenas 70% de germinação. A linhagem 1 não demonstrou tolerância a germinação no frio, isso porque compreende um evento de transformação independente onde o inserto, a construção *Ubi::HSF4D*, pode ser inserida em regiões diferentes do genoma. Próximas etapas compreendem testes de germinação mais robustos e o mapeamento da inserção da construção nas linhagens tolerantes a germinação no frio, bem como novos ensaios de caracterização.

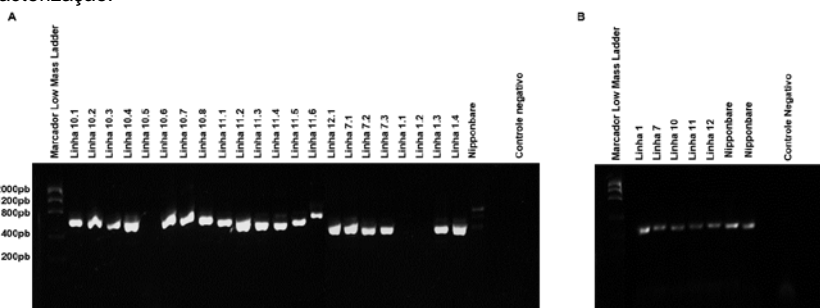
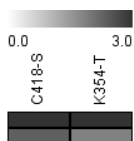


Figura 1. Análises moleculares da construção *Ubi::HSF4D*. A: Amplificação da construção. B: Acúmulo de transcritos do gene *HSFA4D* em plantas de arroz transgênicas.

Tabela 1. Elementos *cis* presentes na região promotora (1 kb *upstream*) do gene *HSFA4D*.

Elemento <i>cis</i>	Sequência	Ocorrência
ACGTTBOX	AACGTT	1
CACTFTPPCA1	TACT; CACT	14
CTRMCAV35S	TCTCTCTCT	2
CURECORECR	GTAC	9
ELRECOREPCR1	TTGACC	2
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	1
POLASIG2	AATTAAT	2
PREATPRODH	ACTCAT	2
TAAAGSTKST1	TAAAG	3
TATABOX3	TATTAAT	1
TRANSINITDICOTS	ACTATGGC	1
WBOXPCWRKY1	TTTGACC	2
Total	12	40



Os02g0181300 / WRKY71
Os05g0530400 / HSF44D

Figura 2. Perfil de expressão dos genes *WRKY71* e *HSF44D* em dois genótipos de arroz, C418 (sensível ao estresse por frio) e K354 (tolerante ao estresse por frio). O acúmulo de transcritos foi comparado entre plantas submetidas a 4°C por 48h e plantas mantidas em condições controle à 25°C. A quantidade de transcritos está expressa em log₂.

Tabela 2. Germinação de sementes T1 provenientes de plantas de *O. sativa* cv. Nipponbare transformadas com a construção *Ubi::HSF4D* (linhas 1, 7, 10, 11 e 12) comparadas com o genótipo selvagem (*O. sativa* cv. Nipponbare), em condições controle e frio.

Genótipo	Tratamento			
	Controle		Frio	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Nipponbare (selvagem)	100%	100%	50%	70%
Linha 1	100%	100%	40%	60%
Linha 7	100%	100%	100%	100%
Linha 10	100%	100%	100%	100%
Linha 11	100%	100%	100%	100%
Linha 12	100%	100%	100%	100%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. Disponível em: <<http://www.citeulike.org/user/echinotrix/article/678648>>. Acesso em: 29 mai. 2017.
- DUNN, M. A. et al. Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (bt4.9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 38, p. 551-564. nov. 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9747801>. Acesso em: 02 mai. 2017.
- GUO, J. et al. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 35, p. 105-118. fev. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1673852708600168>>. Acesso em: 02. mai. 2017.
- JIN, G-H. A systematic view of rice heat shock transcription factor family using phylogenomic analysis. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 321-329. fev. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161712004038>>. Acesso em: 02 mai. 2017.
- KIM, C-Y. et al. Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, OsWRKY71. **Plant Biotechnology Reports**, v. 10, p. 13-23. fev. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11816-015-0383-2>. Acesso em: 02 mai. 2017.
- MATAVELI, L.R.V. et al. Total Arsenic, Cadmium, and Lead Determination in Brazilian Rice Samples Using ICP-MS. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. AI: 3968786. set. 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jamc/2016/3968786/>>. Acesso em: 02 mai. 2017.
- MENQUER, P.K. et al. A walk on the wild side: *Oryza* species as source for rice abiotic stress tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, p. 238-252. mar. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47522017005009102&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 02 mai. 2017.
- TIWARI, V. The Transcriptional Regulatory Mechanism of the Peroxisomal Ascorbate Peroxidase (pAPX) Gene Cloned from an Extreme Halophyte, *Salicornia brachiata*. **Plant Cell Physiology**, v. 55, p. 201-217. jan. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/pcp/pct172>>. Acesso em: 02 mai. 2017.
- ZENG Y.; YANG T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.20, p.417a-417e. dec. 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02772130>>. Acesso em: 29 mai. 2017.