

Regulação de genes *RAV* e sua participação na resposta a estresses abióticos em espécies do gênero *Oryza*

Ana Marina Pedrolo¹, Cássia Fernanda Stafen², Vívian Ebeling Viana³, Camila Pegoraro⁴,
Antônio Costa de Oliveira⁵

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um cereal considerado alimento básico para mais da metade da população mundial. Um dos aspectos limitantes para a produção da cultura é o estresse causado por fatores abióticos. Com os constantes processos de melhoramento houve um estreitamento na base genética das populações utilizadas. Para aumentar a variabilidade pode-se usar outras espécies pertencentes também ao gênero *Oryza*. Para tentar superar o estresse causado por fatores abióticos as plantas desenvolveram uma cascata de sinalização que inicia com a expressão de genes, os quais são regulados por fatores de transcrição (FT). A regulação gênica é feita a partir da ligação desses FT em elementos regulatórios de ação *cis* presentes na região promotora dos genes. Dentre os FT presentes em plantas destaca-se a família *RAV*. Diante do exposto o objetivo desse estudo foi avaliar a regulação de genes das famílias *RAV* em diferentes espécies do gênero *Oryza*. Dessa forma, foram identificados os elementos reguladores de ação *cis* na região promotora putativa de 37 genes de 10 espécies do gênero *Oryza* e da espécie *Leersia perrieri*. Os resultados obtidos demonstraram que os elementos *cis* ARE, CGTCA-box, TGACG - motif e TC-rich motif estiveram presentes nos promotores putativos da maioria dos genes das espécies estudadas, evidenciando a importância desses elementos *cis* na regulação da expressão de genes da família *RAV* em arroz. Esses resultados sugerem que a família *RAV* está envolvida nos mecanismos de tolerância a estresses ambientais nas espécies do gênero *Oryza* e *Leersia perrieri*. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para confirmar os resultados obtidos nesse estudo.

PALAVRAS CHAVES

¹ Engenheira Agrônoma - Mestranda em Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas.

² Bióloga - Mestranda em Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas.

³ Bióloga - Doutoranda em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

⁴ Professora da Universidade Federal de Pelotas.

⁵ Professor PhD da Universidade Federal de Pelotas.

Oryza sativa, elementos *cis*, fatores de transcrição.

Gene regulation of RAV and response to abiotic stresses in species from *Oryza* genus

ABSTRACT

Rice crop (*Oryza sativa* L.) is known to be a basic nutrition source for more than half of the world population. Abiotic factors comprehend one of the major limiting for rice culture. The current improvement processes have been reducing the genetic bases of the employed population. To amplify the genetic variation, other species from *Oryza* genus can be used. Toward to overcome stress caused by abiotic factors plant developed a signaling cascade that initiate with the gene expression, which is regulated by transcription factors (TFs). Gene regulation is performed through the binding of TFs in *cis*-regulatory elements in a promoter region of genes. Between plant TFs stands out the RAV family. Taking to account the above, this study aimed to evaluate the regulation of genes from RAV family in different species of the genus *Oryza*. *Cis*-regulatory elements in the putative promoters of 37 genes from *Oryza* genus and *Leersia perrieri* specie were identified. Results demonstrated that the *cis*-regulatory elements ARE, CGTCA-box, TGACG - motif and TC- rich motif were present in most of the studied putative promoters and species. It demonstrates the importance of these *cis*-regulatory elements in expression regulation of these genes from RAV family in rice. Moreover, these results suggests that the RAV family is involved in tolerance mechanisms caused by environmental stresses in species from *Oryza* genus and *Leersia perrieri*. However, detailed studies are needed to confirm the obtained results in the present study.

KEYWORDS

Oryza sativa, *cis*-regulatory elements, transcription factors.



1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um cereal considerado alimento básico para mais da metade da população mundial. O seu consumo anual per capita é de 54,1 kg por pessoa. A produção prevista para a safra 2017/2018 é de 482,6 milhões de toneladas, sendo os países asiáticos os principais produtores da cultura (USDA, 2017). No Brasil o principal Estado produtor é o Rio Grande Sul, responsável por 68% da produção nacional de arroz (CONAB, 2015).

Um dos maiores desafios da atualidade é atender à crescente demanda por alimentos superando as constantes mudanças climáticas (MICKELBART et al, 2015). Estima-se que, para acompanhar o crescimento previsto da população, será necessário aumentar pelo menos 25% a produção mundial de arroz (LI et al., 2014). Um dos aspectos limitantes para que isso ocorra é o estresse causado por fatores abióticos como extremos de temperatura, excesso ou falta de chuva (BITA & GERATS, 2013; IIZUMI et al, 2014), salinidade e alta radiação solar (CABELLO et al., 2014). Por esse motivo, se faz necessário o desenvolvimento e obtenção de genótipos mais tolerantes que consigam superar essas condições adversas sem perder a produtividade.

O gênero *Oryza* é formado por 23 espécies, destas 21 são selvagens e apenas duas delas cultivadas a *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* Steud. (VAUGHAN e CHANG, 1995). Durante o passar dos anos houve um estreitamento na base genética das populações utilizadas em programas de melhoramento (RANGEL, 1998). Para ampliar a base genética das espécies cultivadas pode-se usar as espécies selvagens do gênero. A variabilidade destas pode servir como fonte para a identificação de genes relacionados a tolerância à estresses abióticos, visto que evoluíram no ambiente natural e estão adaptadas a diversas condições edafoclimáticas (SANTOS et al., 2016).



As plantas estão constantemente sujeitas a mudanças no ambiente, as quais afetam diretamente o seu desenvolvimento e potencial produtivo (YOU et al., 2014). Para tentar superar essas limitações elas desenvolveram mecanismos moleculares mediados por cascatas de sinalização, ou seja, transdução de sinais para ativação de genes específicos. Essa sinalização induz respostas bioquímicas e fisiológicas que dependem da expressão de uma variedade de genes, sendo os fatores de transcrição (FTs) responsáveis por regular esse processo (NAKASHIMA et al., 2014).

FT são proteínas com domínios específicos de ligação que reconhecem determinadas sequências gênicas, conhecidas como elementos regulatórios de ação *cis* que estão localizados na região promotora dos genes (BANERJEE E ROYCHOUDHURY, 2015). Dentre os FT presentes nas plantas pode-se destacar a família RAV (*Related to ABI3/VP1*), que está diretamente envolvida em muitos processos de desenvolvimento como floração, resposta a hormônios e ao estresse causado por fatores bióticos e abióticos (MATÍAS-HERNÁNDEZ et al., 2014).

Existem muitos estudos associando FT com a resposta das plantas frente a estresses abióticos, porém poucas pesquisas têm sido feitas com a família RAV. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar a regulação de genes das famílias RAV em diferentes espécies do gênero *Oryza*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Um grupo de genes da família RAV no gênero *Oryza* foi identificado no banco de dados *Plant Transcription Factor Database* (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) (Tabela 1).

Visando caracterizar a regulação dos genes RAV foram identificados os elementos regulatórios de ação *cis* presentes na região promotora desses genes nas espécies *O. barthii*, *O. brachyantha*, *O. glaberrima*, *O. glumaepatula*, *O. longistaminata*, *O. meridionalis*, *O. nivara*, *O. punctata*, *O. rufipogon*, *O. sativa* spp. *indica*, *O. sativa* spp. *japonica* e *Leersia perrieri*. Para isso, as sequências correspondentes ao promotor putativo (1,5 kb *upstream* do sítio de início da transcrição) de cada gene, para cada

espécie, foram obtidas no banco de dados *Ensembl Plants* (<http://plants.ensembl.org/index.html>). A identificação de elementos regulatórios de ação *cis* foi feita através da utilização do programa *PlantCARE* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)(LESCOT et al. 2002). Consideram-se apenas os elementos regulatórios de ação *cis* que apresentavam *Matrix score* ≥ 5 .

Tabela 1: Genes da família *RAV* no gênero *Oryza* e na espécie *Leersia perrieri*.

<i>O.sativa</i> spp. <i>indica</i>	<i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i>	<i>O.meridionalis</i>
BGIOSGA002747	Os01t0140700	OMERI01G02480
BGIOSGA002753	Os01t0141000	OMERI01G02500
BGIOSGA002748	Os05t0549800	OMERI05G22110
BGIOSGA020315	Os01t0693400	OMERI01G25110
BGIOSGA000982		
<i>O. nivara</i>	<i>O.punctata</i>	<i>Leersia perrieri</i>
ONIVA01G02970	OPUNC01G02270	LPERR01G02380
ONIVA01G02990	OPUNC01G02240	LPERR05G20600
ONIVA05G26000	OPUNC05G22370	LPERR01G02360
ONIVA01G31290	OPUNC01G27280	LPERR01G23470
<i>O. rufipogon</i>	<i>O. glaberrima</i>	<i>O.glumepatula</i>
ORUFI01G02660	ORGLA01G0022400	OGLUM01G02850
ORUFI01G02680	ORGLA01G0022600	OGLUM05G26380
ORUFI01G30390	ORGLA01G0225300	OGLUM01G31260
<i>O. barthii</i>	<i>O. brachyantha</i>	
OBART01G02610	OB01G12600	
OBART01G27360		

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Genes *RAV* estão distribuídos em número variável entre as espécies do gênero *Oryza*, demonstrando que essa família evoluiu de forma diferenciada dentro de cada espécie. No entanto, a regulação desses genes frente a condições de estresses parece semelhante entre as espécies estudadas.

Foram identificados um grande número de elementos regulatórios de ação *cis*, no entanto apenas um pequeno grupo foi comum na maioria dos genes e das espécies (Figura 1). Dentre os elementos comuns pode-se destacar os que são associados a respostas das plantas frente a estresses abióticos. O elemento regulatório de ação *cis* ARE apareceu em 28 genes de dez das 11 espécies estudadas, não estando presente apenas na *Oryza brachyantha*. Esse elemento está relacionado ao mecanismo de resposta a condições de deficiência de oxigênio. Foi observado comportamento semelhante para os elementos regulatórios de ação *cis* *CGTCA –motif*, *TGACG – motif* e *TC-rich repeats*, ambos apareceram na região promotora de pelo menos um dos genes de cada uma das espécies. Os dois primeiros estão envolvidos na resposta ao fitohormônio metil jasmonato (MeJA) e o terceiro faz parte da resposta frente a condições de estresse (Figura 1).

Em condições de hipoxia e anoxia as plantas desencadeiam uma série de mecanismos para tentar superar a falta ou completa ausência de oxigênio. Para isso elas ativam genes que são induzidos em anaerobiose como o gene codificador da enzima álcool desidrogenase (*ADH1*). Na região promotora de genes *ADH* e outros genes cujos produtos estão associados na resposta a deficiência de O_2 são encontrados elementos ARE, indicando que este possui papel regulatório fundamental na resposta ao estresse causado nessas condições (KAUR et al., 2016).

O MeJA é um importante fitohormônio para o desenvolvimento das plantas, pois está envolvido no processo de germinação, crescimento de raízes, floração, amadurecimento de frutos, senescência, bem como na resposta a fatores bióticos e abióticos (RAIKWAR et al., 2015). Em condições de estresse por seca, calor, frio e salinidade há uma alteração nos níveis de MeJA. Para que isso ocorra há a indução de uma série de genes que regulam esse processo (DU et al., 2013). Na região promotora putativa desses genes são encontrados os elementos regulatórios de ação *cis* *CGTCA – motif* e *TGACG – motif*, sugerindo que estes estão associados aos mecanismos de defesa das plantas. O MeJA sintetizado nessas condições regula a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta a estresses bióticos e abióticos.



Em condições ambientais com altas ou baixas temperaturas, seca ou salinidade, ocorre a ativação de genes específicos cujos produtos tem como função ajudar a planta a superar o estresse causado por esses fatores. Na região promotora desses gene há a presença de elementos *TC – rich repeats*, que são conhecidos por serem sinalizados por estresse e estarem relacionados a resposta frente a essas condições ambientais (LI et al., 2016; LIAO et al., 2016).

Com base nesses resultados, acredita-se que dentro do gênero *Oryza*, os produtos dos genes *RAV* estão associados aos mecanismos de defesa das plantas sob condições de estresse. Nesse sentido, genes dessa família são potenciais candidatos para estudos mais aprofundados na busca de mecanismos de tolerância a estresses ambientais.

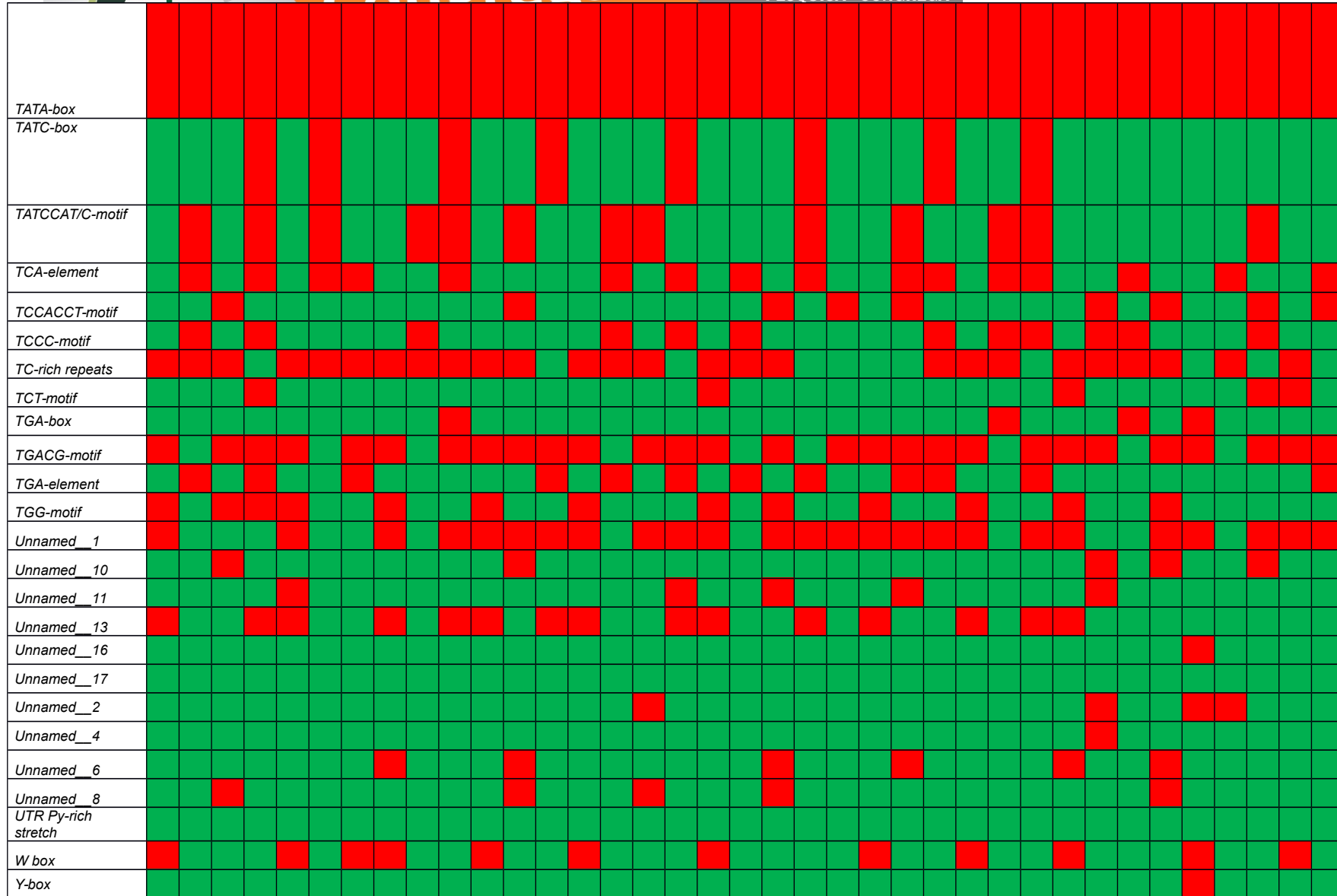


Figura 1: Elementos *cis* na região promotora (1,5 kb) de genes da família *RAV* em diferentes espécies do gênero *Oryza* e da espécie *Leersia perrier*. A cor verde representa a ausência do elemento *cis* e a cor vermelha representa presença do



elemento *cis*. Os elementos *cis* foram identificados utilizando o programa PlantCARE.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de elementos reguladores de ação *cis* associados a resposta a estresses ambientais nos promotores de genes *RAV* sugere que essa família está envolvida nos mecanismos de tolerância nas espécies do gênero *Oryza* e *Leersia perrieri*. Após confirmação desses resultados, esses genes podem ser utilizados no desenvolvimento de genótipos de *Oryza sativa* tolerantes a diferentes estresses.

5 REFERÊNCIAS

- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.
- BITA, C. E. & GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Front. Plant Sci.** v. 4, 2013.
- CABELLO, J. V.; LODEYRO, A. F.; ZURBRIGGEN, M. D. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 26, p.62-70, 2014.
- CONAB, 2015. **Companhia Nacional de Abastecimento. A cultura do arroz.** Organizador Aroldo Antônio de Oliveira Neto. – Brasília: Conab, 2015. 180 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 16 de agosto de 2017
- DU, H.; LIU H.; XIONG, L. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. **Frontiers in plant Science.** v.4, 2013.
- IZUMI, T.; SAKUMA, H.; YOKOZAWA, M.; LUO, J-J.; CHALLINOR, A. J.; BROWN, M. E.; YAMAGATA, G. S. T. Prediction of seasonal climate-induced variations in global food production. **Nature Climate Change**, [s.l.], v. 3, n. 10, p.904-908, 2013.
- KAUR, G.; PATI, P. K. Analysis of cis-acting regulatory elements of Respiratory burst oxidase homolog (Rboh) gene families in Arabidopsis and rice provides clues for their diverse functions. **Computational biology and chemistry**, v. 62, p. 104-118, 2016.
- LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER, Y.; ROMBAUTS, S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a



portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, v.30(1), p.325–327, 2002.

LI, J.; WANG, J; ZEIGLER, R. S. The 3,000 rice genomes project: new opportunities and challenges for future rice research. **Gigascience**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-3, 2014.

LI, X.; HAN, H.; CHEN, M.; YANG, W.; LIU, L.; LI, N.; DING, X.; CHU, Z. Overexpression of *OsDT11*, which encodes a novel cysteine-rich peptide, enhances drought tolerance and increases ABA concentration in rice. **Plant molecular biology**, v. 93(1-2), p. 21-34, 2016.

LIAO, P.; HUANG, J.; TONG, P.; NIE, W.; YAN, X.; FENG, Y.; PENG, H.; PENG, X.; LI, S. Characterization and expression analysis of inositolphosphorylceramide synthase family genes in rice (*Oryza sativa* L.). **Genes & Genomics**, v. 39(5), p. 485-492, 2016.

MATÍAS-HERNÁNDEZ, L.; AGUILAR-JARAMILLO, A. E.; MARÍN-GONZÁLEZ, E.; SUÁREZ-LÓPEZ, P.; PELAZ, S. RAV genes: regulation of floral induction and beyond. **Annals of botany**, v. 114, n. 7, p. 1459-1470, 2014.

MICKELBART, M. V.; HASEGAWA, P. M.; BAILEY-SERRES, J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.237-251, 2015.

NAKASHIMA, K.; JAN, A.; TODAKA, D.; MARUYAMA, K.; GOTO, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Comparative functional analysis of six drought-responsive promoters in transgenic rice. **Planta**, v. 239, n. 1, p. 47-60, 2014.

PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences.

RAIKWAR, S.; SRIVASTAVA, V. K.; GILL, S. S.; TUTEJA, R.; TUTEJA, N. Emerging Importance of Helicases in Plant Stress Tolerance: Characterization of *Oryza sativa* Repair Helicase XPB2 Promoter and Its Functional Validation in Tobacco under Multiple Stresses. **Frontiers in plant science**, v.6 ,2015.

RANGEL, P.H.N. Origem e evolução do arroz. In I Curso Internacional de Melhoramento Genético de Arroz. Goiânia, p. 16-27, 1998.



SANTOS, R. S.; VIANA, V.E.; FARIAS, D. R.; ARAUJO JUNIOR, A. T.; OLIVEIRA, A. C. . IDENTIFICAÇÃO E FILOGENIA DA FAMÍLIA WRKY EM *Oryza glumaepatula*. **Revista Congrega Urcamp** (CD-ROM), v. -, p. -, 2016.

USDA, 2017. **Economic Research Service - Rice Outlook**. August 14, 2017. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/84727/rcs-17h.pdf?v=42961>. Acesso em: 16 de agosto de 2017

VAUGHAN, D. A.; CHANG, T.T. **Collecting the rice gene pool**. In: GUARINO, L.; RAMANATHA RAO, V.; REID, R. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*. Wallingford: CAB International, p.659-675, 1995.

YOU, J.; ZONG, W.; DU, H.; HU, H.; XIONG, L. A special member of the rice SRO family, OsSRO1c, mediates responses to multiple abiotic stresses through interaction with various transcription factors. **Plant molecular biology**, v. 84, n. 6, p. 693-705, 2014.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não possuir nenhum tipo de conflito de interesses.



AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

A.M.P. análises; A.M.P., C.F.S., V.E.V. e C.P. interpretação e escrita do trabalho; C.P., A.C.O. conceberam o estudo e supervisionaram a pesquisa.