

IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADOS POR FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA bZIP SUPER EXPRESSOS EM RESPOSTA À TOXIDEX POR FERRO EM ARROZ

Leomar Guilherme Woyann¹; Taciane Finatto²; Nathalie Picault³; Carlos Busanello⁴; Cristian Chaparro³; Luciano Carlos da Maia⁵; Olivier Panaud³; Antonio Costa de Oliveira⁵

Palavras-chave: elementos regulatórios de ação *cis*, regulação gênica, cascatas de sinalização, estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

No sistema de cultivo de arroz irrigado por inundação, quando há presença de excesso de ferro na composição do solo, devido às condições anaeróbicas presentes, ocorre a redução dos íons Fe^{3+} para Fe^{2+} que são prontamente disponíveis para as plantas. Entre os sintomas de toxidez por ferro, destacam-se a toxidez direta, que é a absorção excessiva de Fe^{2+} e sua translocação para as folhas, gerando sintomas como o bronzeamento, amarelecimento e necrose foliar (MENGEL e KIRKBY, 1982) e a toxidez indireta, que ocorre pela absorção limitada de outros micronutrientes essenciais ocasionando amarelecimento das plantas e redução do número de afilhos (MARSCHNER et al., 1986). Genótipos sensíveis a esse tipo de estresse apresentam redução significativa na produtividade.

Em condições de estresse, as plantas desencadeiam respostas em nível molecular, ativando cascatas de sinalização que suprimem ou aumentam a expressão de genes alvo. Os fatores de transcrição (FTs) são proteínas que regulam a transcrição gênica, desta forma, as modificações nas atividades dos FTs alteram dinamicamente o transcriptoma, ocasionando alterações metabólicas e fenotípicas em resposta a determinado estímulo ambiental (MITSUDA e OHME-TAKAGI, 2009). Em eucariotos, a regulação transcricional é mediada pelo recrutamento de FTs que reconhecem e ligam-se a elementos regulatórios de ação *cis* (ERAC), que são pequenas sequências de DNA presentes na região promotora dos genes. Os FTs interagem com estes ERACs específicos, com outros FTs, e com a maquinaria basal de transcrição para regular a expressão dos genes alvo (PRIEST et al., 2009).

As proteínas do tipo região básica e zíper de leucina (domínio bZIP) são FTs que apresentam uma região básica que permite a ligação com o DNA e o zíper de leucina, permitindo a formação do dímero (ELLENBERGER, 1994). Em arroz, pesquisas recentes indicam que FTs bZIP apresentam expressão diferencial em plântulas em resposta a estresses (NIJHAWAN et al., 2008). Entre os estresses bióticos destaca-se a resposta à ação patogênica do fungo *Magnaporthe oryzae*, e em resposta a estresses abióticos a expressão de genes bZIP foi induzida em plântulas em condições de elevada salinidade, seca e frio (ZOU et al., 2008), e em folhas e raízes em resposta ao estresse por frio, anoxia, salinidade, seca, estresse oxidativo e ácido abscísico (HOSSAIN et al., 2010).

¹Estudante de graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Centro de Genômica e Fitomelhoramento - 3º andar Universidade Federal de Pelotas - Campus Universitário, CEP: 96010-900, Capão do Leão – RS - leowoyann@gmail.com

²Estudante de doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitomelhoramento, Universidade Federal de Pelotas.

³Professor da Universidade de Perpignan *Via Domitia*, Laboratório de Genoma e Desenvolvimento de Plantas, Perpignan, França.

⁴Estudante graduação em Agronomia do Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Maria.

⁵Professor do Departamento de Fitotecnica, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Este trabalho teve por objetivo identificar os genes super expressos regulados pelos FTs da família bZIP em plântulas de arroz *Oryza sativa* subsp. *japonica* submetidas ao estresse por toxidez de ferro.

MATERIAL E MÉTODOS

No estudo foi utilizada a cultivar de arroz Nipponbare (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*), escolhida por apresentar genoma totalmente sequenciado (IRGSP, 2005) com anotação gênica avançada (RAP 5 – *Rice Annotation Genome Project*). O experimento foi estabelecido em hidroponia, onde as sementes foram pré-germinadas e posteriormente transferidas para baldes contendo solução nutritiva completa, conforme descrito por Camargo e Oliveira (1981), em delineamento experimental completamente casualizado com três repetições. As plantas foram cultivadas nestas condições por quatorze dias, sendo que a solução nutritiva foi renovada aos sete dias. No décimo quarto dia, as plantas da solução controle foram trocadas para uma nova solução nutritiva completa e pH 5,5 e as plantas da solução tratamento foram trocadas para solução nutritiva completa adicionada de 7mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + EDTA e pH 4,5, permaneceram nesta solução durante quatro dias. Transcorrido esse período, procedeu-se a coleta das amostras. A extração do RNA total foi realizada a partir de tecido foliar, utilizando o reagente *TRIzol* (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram purificadas com o kit *RNeasy* (Qiagen). Para hibridização no microarranjo foi realizada a síntese do cDNA (DNA complementar) a partir do RNA mensageiro, segundo o protocolo *Synthesis of Double-Stranded cDNA* (NimbleGen), utilizando o kit *SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis* (Invitrogen). Posteriormente o cDNA foi enviado para a NimbleGen, onde as três repetições de cada condição foram marcadas com o fluorocromo cianina 3 - cy3 (*single channel*) e hibridizadas com as sondas do microarranjo *Rice transposome array v.2.0* (PICAULT et al., 2009) e produzido com a tecnologia NimbleGen™ sendo composto por 385.000 sondas/oligonucleotídeos selecionadas pelo conteúdo GC e T_m (*temperature of melting*). Este microarranjo contém 90.000 sondas representando 45.000 genes de *Oryza sativa* subsp. *japonica* (2 sondas/oligonucleotídeos por gene). Os oligonucleotídeos foram construídos para a extremidade 3' dos genes no intuito de detectar as fitas sintetizadas pela transcriptase reversa. A análise dos dados de expressão foi realizada utilizando o software *R* (*R Development Core Team*, 2006) e os pacotes *Limma* e *Biobase* do software *Bioconductor*. Foi realizado o teste-*t* Bayesiano e o método de ajustamento por BH. A anotação da descrição dos genes foi realizada no banco de dados do RAP-DB versão 5, e a ontologia gênica foi realizada utilizando o programa *Blast2GO* (CONESA et al., 2005). Para identificar os genes regulados pelos fatores de transcrição bZIP, primeiramente foi realizada busca no banco de dados PLACE (HIGO et al., 1998) por ERACs responsivos a estresses e regulados pelos FTs da família bZIP, posteriormente foi recortada a região promotora de 1000 pares de bases à montante ao início de 1569 genes super expressos ($\log_2 \text{fold-change} \geq 1$, $P \leq 0,05$) em resposta ao estresse por toxidez de ferro no microarranjo. Posteriormente, foi realizada a busca da ocorrência ERACs na região promotora utilizando o teste *Z* ($P \leq 0,05$) segundo a técnica descrita por Nemhauser et al. (2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No microarranjo foram identificados quatro FTs da família bZIP (Tabela 1). No banco de dados do PLACE foram encontrados 33 ERACs reconhecidos como sítios de ligação ao DNA pelos FTs da família bZIP. Destes, sete são reportados na literatura em resposta a estresses bióticos e abióticos, portanto, a busca pela ocorrência significativa ($P \leq 0,05$) dos ERACs nas regiões promotoras dos 1.569 genes foi realizada com base nestes

sete ERACs. Foram encontradas 255 regiões promotoras com pelo menos uma ocorrência significativa de um dos sete ERACs. O ERAC mais freqüente foi ASF1MOTIFCAMV ocorrendo em 76,47% dos 255 analisados, seguido de ABREATCONSENSUS (28%), EMBP1TAEM (16%), ABADES11 e UPRE2AT (3,9%), ABADES12 e UPRE1AT (0,39%) (Tabela 2). Seis genes apresentam em seu promotor três ERACs reconhecidos por bZIP, 48 apresentam dois e 201 genes apresentaram apenas um ERAC. Os 255 genes potencialmente regulados pelos FTs bZIP participam de processos biológicos como metabólicos primários (11,6), processos metabólicos celulares (9,5%); processos biossintéticos (7,4%); resposta a estresses (2,7%); respostas a estímulos abióticos (1,7%) e processos de sinalização (1,3%) entre outros.

Tabela 1. Identificação (*locus ID*) e nível de expressão no microarranjo \log_2FC (*log₂-fold-change*) dos genes codificadores dos fatores de transcrição da família bZIP em resposta à toxidez por ferro em arroz (*Oryza sativa ssp japonica* cv. Nipponbare).

<i>Locus ID</i>	<i>Log₂FC</i>
Os03g0322700	1,48
Os07g0124300	1,35
Os11g0154900	1,88
Os12g0601800	1,67

* $P \leq 0,05$ pelo teste-*t* Bayesiano.

Tabela 2. Identificação dos elementos regulatórios de ação *cis* (ERAC ID), número de ocorrências nos promotores dos 255 genes super expressos (NOP) e número máximo de ocorrências por promotor (NMOP). Os valores entre parênteses indicam o número de promotores para o respectivo NMOP.

<i>ERAC ID</i>	<i>NOP</i>	<i>NMOP</i>
ABADES11	10	2 (1)
ABADES12	1	1 (1)
ABREATCONSENSUS	72	3 (1)
ASF1MOTIFCAMV	195	10 (1)
EMBP1TAEM	41	3 (1)
UPRE1AT	1	1 (1)
UPRE2AT	10	1 (10)

Entre os genes que respondem a estresses e participam de processos de sinalização destacam-se alguns fatores de transcrição: um da família ERF (responsivos ao etileno), um FT de proteínas induzidas por déficit hídrico (WDS) e ácido abscísico (ABA), seis FTs da família dedo de zinco, dois FTs da família GRAS, dois WRKY, um gene para *helix-loop-helix*, e um para HSP (proteínas de choque térmico). Entre outros genes importantes na resposta a estresse oxidativo, um gene codificador de peroxidase, uma metalotioneína, 19 genes de proteínas quinases incluindo cinco serina-treoninas quinases e três genes codificadores de quinases associadas à parede celular. As proteínas quinases participam da transdução de sinais na cascata das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógeno) que é uma via de sinalização intracelular mediadora de respostas a estresses. Entre os genes que participam do processo biológico de transporte, dois codificam proteínas de transporte e detoxificação de metais pesados da família MATE, oito genes do citocromo P450, e três genes codificadores de tioredoxinas. Considerando as funções essenciais e de proteção conferidas pelos genes regulados por FTs bZIP e o aumento dos níveis de expressão em resposta à toxidez por ferro é razoável considerar que os quatro FTs bZIP super expressos neste estudo associados a outros FTs que participam de suas redes de regulação apresentam importância relevante na resposta do arroz a este estresse. A importância do FT bZIP foi verificada em estudos realizados por Xiang et al., (2008) onde plantas de arroz transgênicas que super expressavam o gene *OsbZIP23* apresentaram aumento da tolerância à seca, à elevada salinidade e sensibilidade ao ABA. Além disto, nestas plantas transgênicas, aproximadamente 800 genes apresentaram super expressão, o que evidencia sua regulação pelo gene *OsbZIP23*.

CONCLUSÃO

Os genes da família bZIP *Os03g0322700*, *Os07g0124300*, *Os11g0154900*, *Os12g0601800* super expressos em resposta à toxidez por ferro reconhecem elementos

regulatórios de ação *cis* presentes em 255 genes também super expressos nesta condição. Estes genes incluem outros fatores de transcrição, genes envolvidos em cascatas de MAP quinases, transporte e detoxificação de metais. Estudos futuros de transformação genética, como a super expressão dos FTs bZIP em cultivares sensíveis e/ou silenciamento em cultivares tolerantes, poderão confirmar que a regulação destes 255 genes é realizada por estes FTs em resposta à toxidez por ferro em arroz.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq, CAPES, Programa CAPES-COFECUB e FAPERGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, C.E.O.; OLIVEIRA, O.F. Tolerance of wheat cultivars to different aluminum levels in nutrient solution and soil. *Bragantia*, v.49, p.21-23, 1981.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, v.21, p.3674-3676, 2005.
- ELLENBERGER, T. Getting a grip in DNA recognition: structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains. *Current Opinion in Structural Biology*, v.4, n.1, p. 12-21, 1994.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; HIGO, H. PLACE: a database of plant cis-acting regulatory DNA elements. *Nucleic Acids Research*, v.26, n.1, 1998.
- HOSSAIN, M. A.; CHO, J.; HAN, M.; AHN, C.H.; JEON, J.S.; AN, G.; PARK, P.B. The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice. *Journal of Plant Physiology*. v.167, n.17, p.1512-1520, 2010.
- IRGSP (The International Rice Genome Sequencing Project). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, v.436, p.793-800, 2005.
- MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V.; KISSEL, M. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition*, v.9, p.695-713, 1986.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. 3. ed. Bern: International Potash Institute, 1982. 655p.
- MITSUDA, N.; OHME-TAKAGI, N. Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, v.50, n.7, p.1232-1248, 2009.
- NEMHAUSER, J.L.; MOCKLER, T.C.; CHORY, J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biology*, v.2, n.9, p.259, 2004.
- NIJHAWAN, A.; JAIN, M.; TYAGI, A. K.; KHURANA. J. P. Genomic Survey and Gene Expression Analysis of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor Family in Rice. *Plant Physiology*, v.146, n.2, p.333-350, 2008.
- PICAULT, N.; CHAPARRO, C.; PIEGU, B.; STENGER, W.; FORMEY, D.; LLAURO, C.; DESCOMBIN, J.; SABOT, F.; LASSERRE, E.; MEYNARD, D.; GUIDERDONI, E.; PANAUD, O. Identification of an active LTR retrotransposon in rice. *Plant Journal*, v.58, p.754-765, 2009.
- PRIEST, H. D.; FILICHKIN, S. A.; MOCKLER, T. C. Cis-Regulatory elements in plant cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, v.12, n.5, p.643-649, 2009.
- R: A Language and Environment for Statistical Computing (2006), R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>
- XIANG, Y.; TANG, N.; DU, H.; YE, H.; XIONG, L. Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiology*, v.148, p.1938-1952, 2008.
- ZOU, M.; GUAN, Y.; REN, H.; ZHANG, F.; CHEN, F. A bZIP transcription factor, *OsABI5*, is involved in rice fertility and stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, v.66, n.6, p.675-683, 2008.