

FORMAÇÃO DO AMIDO EM ARROZ: DIFERENÇAS NA REGULAÇÃO DE GENES DE SÍNTESE EM ARROZ INDICA E JAPONICA SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

KARINE E. JANNER DE FREITAS¹; RAILSON SCHREINERT DOS SANTOS²;
ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – karinejanner@gmail.com

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha –
railson.schreinert@iffarroupilha.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – acostol@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais alimentos na dieta humana. No entanto, a produção deste cereal enfrenta desafios associados ao aumento populacional, e constantes alterações ambientais (Fahad et al., 2019). Os consumidores de arroz avaliam a qualidade do grão de arroz em função de seus atributos físicos e sensoriais, com um enfoque robusto em seu aroma e características de cozimento relacionados a amilose e amilopectina na formação do amido (Ebron, 2013). A biossíntese do amido no arroz é um processo complexo e altamente regulado, que requer atividades coordenadas entre múltiplas enzimas, incluindo AGPL1, AGPL3, AGPL4, AGPS2a, SBE1, SBE3, DPE1, PUL, ISA, SSI, SSII1, SSII2, ALK, SSIII1, SSIII2, SSIV1, SSIV2, GBSSII e WAXY.

Porém os estresses abióticos afetam e modificam os atributos do amido e cozimento do grão de arroz, sendo os estresses especialmente relacionados a temperatura, desidratação e salinidade, que têm uma grande influência nos atributos da qualidade do grão, alterando traços sensoriais e podendo levar a uma diminuição na aceitação geral do consumidor (Chun et al., 2009).

A resposta da planta a esses estresses abióticos envolve sinalização e ativação de fatores de transcrição (FTs) que por sua vez se ligam a elementos de regulação cis (CREs). Estes atuam na ativação ou repressão de genes alvo, sendo extremamente importantes na mediação de respostas a estresses. Contudo, a maior ocorrência e diversidade de CREs pode auxiliar na especificidade das respostas a estresses (Kaur et al., 2017).

Os grupos mais cultivados de arroz, *O. sativa* subsp. *japonica* e *O. sativa* subsp. *indica*, apresentam aspectos físicos e sensoriais de grão diferentes. Porém ainda não se sabe se estas duas subespécies também apresentam regulação diferencial em relação aos genes de síntese de amido quando frente aos principais estresses que afetam a qualidade de grão, como desidratação, temperaturas extremas e salinidade do solo. Contudo, a exploração de CREs presentes nos promotores de genes ligados a síntese de amido (SSRGs, do inglês *Starch Synthesis Genes*) dessas duas subespécies pode trazer novas informações que auxiliem no entendimento da dinâmica de defesa da planta alterando a complexa rota de síntese de amido estes genótipos.

Tendo em vista a importância dos SSRGs na formação do amido e a sinalização molecular frente a estresses abióticos, este estudo teve como objetivo realizar uma análise comparativa da ocorrência de CREs em *O. sativa* subsp. *japonica* e *O. sativa* subsp. *indica*.

2. METODOLOGIA

As regiões promotoras preditas (1kb *upstream* do sítio de início da transcrição) dos SSRGs (AGPL1, AGPL3, AGPL4, AGPS2a, SBE1, SBE3, DPE1, PUL, ISA, SSI, SSII1, SSII2, ALK, SSIII1, SSIII2, SSIV1, SSIV2, GBSSII e WAXY) foram obtidas no banco de dados *The Rice Annotation Project Database* (RAP-DB) (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) e *Ensembl Plants* (<https://plants.ensembl.org/index.html>) a partir do genoma de *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare. Posteriormente a sequência promotora predita foi submetida à análise de presença de CREs no banco de dados *New PLACE (A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements)* (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>). Os resultados foram comparados a bibliografia disponível.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização de promotores dos SSRGs quanto a presença de CREs em *O. sativa* subsp. *japonica* e *O. sativa* subsp. *indica* é importante para compreender diferenças na regulação transcricional das duas subespécies frente aos principais estresses abióticos que acometem a qualidade do grão de arroz.

Neste estudo, um total de 22 diferentes CREs relacionados a desidratação foram identificados, além de 7 e 3 CREs relacionados a temperatura e salinidade, respectivamente. Neste sentido, pode-se observar que entre os genes SSRGs, existem alguns CREs comuns nos promotores de todas as isoformas analisadas. MYCCONSensusAT é o mais frequente e abundante CRE relacionado a desidratação, além de MYBCORE, sendo estes dependentes da sinalização via ABA (ácido abscísico) (Abe et al., 1997). O que indica que estas isoformas podem ser reguladas de forma similar (Tabela 1). Em relação a salinidade, ARR1AT é o mais frequente e abundante CRE identificado entre todos os genes, porém é regulador negativo através da sinalização por citocinina (Hamamoto et al., 2015).

Entretanto, percebe-se que existe certa vantagem em relação a presença de CREs relacionados a desidratação entre *O. sativa* subsp. *japonica* e *O. sativa* subsp. *indica* sendo a segunda subespécie a que possui maior frequência e diversidade com 903 ocorrências de CREs identificados. Apenas o gene *Waxy* de *O. sativa* subsp. *japonica* apresenta maior diversidade. Isso pode demonstrar que há maior resistência dos genótipos oriundos de *O. sativa* subsp. *indica* em relação ao estresse ocasionado pela desidratação devido à presença maior de CREs alvo de FTs nos promotores dos genes, o que já foi relatado por outros autores (Illey & Ludlow, 1996). Além disso, esses CREs nos promotores dos genes SSRGs, através da ligação do FTs nessas regiões, auxiliam para que a planta possa realizar de maneira síncrona a formação de amilose e amilopectina, já que a rota para formação dessas duas cadeias é extremamente complexa e necessita da expressão e atuação de todos os genes/enzimas que compõem a rota, e, portanto, sendo extremamente susceptível aos estresses abióticos (Beckles & Thitisaksakul, 2014).

Quanto ao estresse causado por variação de temperatura, percebe-se que *O. sativa* subsp. *japonica* e *O. sativa* subsp. *indica* apresentam praticamente a mesma frequência de CREs, apesar de estudos apontarem a maior resistência de genótipos de *O. sativa* subsp. *japonica* frente a temperaturas baixas (Kumar et al.,

2017). Apesar disso, o CRE mais abundante entre as subespécies foi CCAATBOX, o elemento de choque térmico, que é conhecido por responder a estresse térmico (Wang et al., 2019).

O mesmo pode ser observado entre as subespécies para o número de CREs relacionados ao estresse salino, apesar de *O. sativa* subsp. *japonica* apresentar maior número de CREs, com 242, enquanto *O. sativa* subsp. *indica* possui apenas 223. Isto pode ter correlação com a maior resistência de genótipos de *O. sativa* subsp. *japonica* frente ao estresse causado por solos salinos, como já citado por De Souza et al (2012).

	DESIDRATAÇÃO																																						
	AGPL1		AGPL3		AGPL4		AGPS2A		SBE1		SBE3		DPE1		ISA		PUL		SSI		SSII1		SSII2		ALK		GBSSII		SSIII1		SSIII2		SSIV1		SSIV2		Waxy		
	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	
MYCCONSENSUSAT	13	16	11	14	9	12	10	12	10	20	19	20	11	14	10	12	22	14	14	24	8	10	12	6	10	10	24	32	21	18	11	22	6	6	13	16	8	8	
MYB1AT	1	0	2	1	3	2	4	4	4	1	0	1	1	2	5	3	0	3	1	0	3	3	4	4	5	4	2	2	0	2	3	2	0	0	2	1	3	3	
MYBCORE	5	3	2	6	2	2	4	9	5	4	1	4	3	6	4	6	6	1	5	6	6	7	2	6	5	9	6	6	1	4	6	3	2	12	4	7	5	7	
MYB2CONSENSUSAT	2	3	0	2	0	0	0	3	1	2	0	1	2	2	1	2	0	0	3	4	3	2	0	1	15	3	4	4	0	1	2	1	2	3	1	1	3	2	
ACGTATERD1	5	8	14	14	7	6	3	0	5	2	2	4	4	8	2	6	6	12	12	4	4	8	4	10	16	12	3	4	24	18	4	8	2	6	7	4	20		
ABRELATERD1	4	5	6	6	3	1	0	0	1	0	2	1	3	7	0	0	1	3	5	2	1	2	2	5	2	3	3	4	8	6	0	1	0	0	0	8	1		
MYB2AT	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
CBFHV	0	1	1	1	3	3	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	2	1	1	1	2	2	2	0	3	3	0	0	9	7	1	0	8	4	1	2	6	2
MYBST1	0	1	1	1	1	3	3	5	1	1	3	3	5	2	2	2	0	2	4	2	1	1	2	3	3	4	4	1	1	2	1	2	2	0	1	0	2		
MYCATERD1	0	1	0	1	2	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	0	2	0	3	0	1	1	1	0	0	3	4	0	4	0	4	1	1	2	3	0	1		
MYCATRD22	0	1	0	1	3	1	1	1	1	1	5	2	0	0	0	0	0	2	2	3	3	1	1	1	0	0	6	4	4	4	0	4	1	1	3	3	0	1	
MYBPLANT	0	0	1	2	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	2	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0		
MYBPZM	0	0	2	2	1	0	4	1	0	1	2	2	0	0	0	3	2	2	1	2	2	2	2	3	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	0	1	0	1	
MYBCOREATCYCB1	0	0	0	3	0	0	0	5	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	2	0	5	0	1	0	2	0	1	0	6	0	3	0	2	
DRECRTCOREAT	0	0	0	0	3	3	1	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	3	0	0	5	4	1	0	6	2	0	2	
DREDRIATR29AB	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ABRERATCAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BOXLCOREDCPAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
AGMOTIFNTMYB2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
MYBATRD22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
MYB26PS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
DRE1COREZMRAB17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Σ	30	40	40	54	38	35	33	43	30	33	39	43	30	44	27	44	41	51	49	58	38	48	34	42	63	58	56	67	73	72	30	48	33	46	34	43	55	34	
	TEMPERATURA																																						
	AGPL1		AGPL3		AGPL4		AGPS2A		SBE1		SBE3		DPE1		ISA		PUL		SSI		SSII1		SSII2		ALK		GBSSII		SSIII1		SSIII2		SSIV1		SSIV2		WAXY		
	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	
LTREATLT178	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
LTRECOREATCOR15	0	0	1	1	4	2	1	0	0	0	4	1	2	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3	0	1	7	6	1	0	8	2	1	2	2	0
LTRE1HVBTL49	0	0	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0		
CRTDREHVCBF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	2	2	2	2	2	2	
CARGATCONSENSUS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0		
AUXRETGA1GMGH3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
CCAATBOX1	1	1	5	5	6	2	2	1	3	3	2	4	2	2	4	1	1	6	3	4	6	6	2	0	3	2	0	2	2	3	0	2	2	0	3	5	1	1	
Σ	1	1	8	7	12	6	4	1	3	3	6	5	4	4	8	3	4	9	3	4	7	5	1	8	8	1	4	13	12	3	5	12	5	6	9	5	3		
	Salinidade																																						
	AGPL1		AGPL3		AGPL4		AGPS2A		SBE1		SBE3		DPE1		ISA		PUL		SSI		SSII1		SSII2		ALK		GBSSII		SSIII1		SSIII2		SSIV1		SSIV2		WAXY		
	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	jap	ind	
ARR1AT	21	16	15	19	15	10	9	11	0	10	9	11	17	11	13	8	13	11	14	12	14	14	8	5	15	12	17	15	8	10	19	8	7	13	11	12	7	14	
GT1GMSCAM4	0	0	4	0	0	0	0	4	0	1	0	5	0	2	0	3	0	7	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	
AGCBOXNPGLB	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
Σ	21	16	19	19	15	10	9	11	5	10	11	12	22	11	15	8	16	11	21	12	14	14	9	5	17	12	17	15	8	10	23	8	8	13	15	12	8	14	

4. CONCLUSÕES

Neste estudo fica evidente a importância do estudo dos CREs para maior compreensão do comportamento dos genótipos frente a estresses. Contudo, *O. sativa* subsp. *indica* parece ser mais responsiva ou ter uma regulação mais complexa à desidratação devido a maior presença de CREs relacionados com este tipo de estresse nos promotores de seus SSRGs. O impacto da presença destes CREs na qualidade de grão no arroz sob estresse hídrico ainda precisa ser melhor avaliada. A subespecie *japonica* parece ser mais responsiva quando consideramos CREs relacionados ao estresse salino. Por outro lado, no estresse causado por temperaturas extremas, as duas subespécies são bastante similares na presença de CREs, apesar de estudos apont

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; IWASAKI, T.; HOSOKAWA, D.; & SHINOZAKI, K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. **The Plant Cell**, v.9, n.10, pp.1859-1868, 1997.

BECKLES, D. M.; & THITISAKSAKUL, M. How environmental stress affects starch composition and functionality in cereal endosperm. **Starch-Stärke**, v.66, n.1-2, pp. 58-71, 2014.

CHUN, A.; SONG, J.; KIM, K.J.; LEE, H.J. Quality of head and chalky rice and deterioration of eating quality by chalky rice. **Journal Crop Science Biotechnology**, v.12, n. 239244, 2009.

DE SOUZA LIMA, M.D.G.; LOPES, N.F.; ZIMMER, P.D.; MENEGHELLO, G.E.; MENDES, C. R.; & DO AMARANTE, L. Enzyme expression in indica and japonica rice cultivars under saline stress. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.34, n.4, pp.473-481, 2012.

EBRON, G. In search of the perfect grain. **Rice Today**, v.12, p.15-17, 2013.

FAHAD, S.; NOOR, M.; ADNAN, M.; KHAN, MA.; RAHMAN, IU.; ALAM, M.; et al. **Abiotic stress and ricegrain quality**. Woodhead Publishing, Elsevier: Cambridge.

HAMAMOTO, S.; HORIE, T.; HAUSER, F.; DEINLEIN, U.; SCHROEDER, J. I.; & UOZUMI, N. HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. **Current opinion in biotechnology**, v.32, pp.113-120, 2015.

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.12, n.9, pp. e0184523, 2017.

KUMAR, M.; GHO, Y.S.; JUNG, K.H. & KIM, S.R. Genome-Wide Identification and Analysis of Genes, Conserved between *japonica* and *indica* Rice Cultivars, that Respond to Low-Temperature Stress at the Vegetative Growth Stage. **Frontiers Plant Science**, v.8, pp.1120, 2017.

ILILLEY, J.M.; & LUDLOW, M.M. Expression of osmotic adjustment and dehydration tolerance in diverse rice lines. **Field Crops Research**, v.48, 2-3), 185-197, 1996.

WANG, C.; GAO, G.; CAO, S. *et al.* Isolation and functional validation of the *CmLOX08* promoter associated with signalling molecule and abiotic stress responses in oriental melon, *Cucumis melo* var. *makuwa* Makino. **BMC Plant Biology**, v.19, n.75, 2019.