

ANÁLISE *IN-SILICO* DE ELEMENTOS *CIS-ACTING* EM REGIÕES PROMOTORAS DE GENES ARGONAUTAS EM ARROZ (*ORYZA SATIVA* L.)

SILVEIRA, Roberta Maraninchi¹; FARIAS, Daniel da Rosa²; Maia, Luciano Carlos da³; COSTA DE OLIVEIRA, Antonio³

¹Graduando em Biotecnologia, estagiária em Fitomelhoramento- Dep. Fitotecnia, FAEM/UFPeI;

²Estudante de Pós-graduação em Agronomia – Fitomelhoramento, FAEM/UFPeI; ³Engº Agrônomo, Dr., Prof. Dep. de Fitotecnia, FAEM/UFPeI – msilveira.roberta@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. Os países em desenvolvimento têm no arroz uma importante cultura sob o ponto de vista social e econômico, pois este é considerado um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, que se adapta a diferentes condições de solo e clima (AZAMBUJA et al., 2004).

A produção mundial de arroz em casca em 2010 foi aproximadamente 672 milhões de toneladas em uma área de 153 milhões de hectares (FAO, 2012). O Brasil ocupa a 9ª posição, segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) (2012) e produziu 11,66 milhões de toneladas, nesse mesmo ano, tendo o Rio Grande do Sul como principal estado produtor, responsável por 63% da produção nacional.

Genes *argonautas* e proteínas relacionadas são efetores de mecanismos de silenciamento de RNA, em que mRNAs são clivadas, a tradução de proteínas é suprimida, ou modificações epigenéticas são introduzidas no DNA (HAVECKER et al., 2010). A maioria dos trabalhos realizados com esses genes foram na espécie *Arabidopsis thaliana*, como o de Sorin et al. (2005) que demonstraram que em resposta a auxina exógena um gene dessa família alterava a capacidade de produção de raízes adventícias. Além disso, Segundo Miyashima et al. (2009), o gene *ago1* atua na padronização radial da raiz e a perda de função desse gene perturba a assimetria radial do tecido radicular.

Elementos *cis-acting* são regiões do DNA que atuam como interruptores moleculares envolvidos na regulação da transcrição de uma rede gênica dinâmica (STRÄHLE & RASTEGAR, 2007). O conhecimento dos elementos presentes na região promotora de genes *argonautas* em arroz, contribuirá para a compreensão dos sistemas reguladores da expressão da rede gênica em que esses genes participam, desta forma, o objetivo desse trabalho é identificar os elementos *cis-acting* presentes na região promotora de genes *argonautas* em arroz.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Seqüências de DNA dos genes *argonautas* de *Arabidopsis*, foram obtidas do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após, foram encontrados genes de arroz que apresentaram similaridade com essas seqüências, utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Seqüências com *e-value* menor ou igual que $1e^{-10}$ e com mínimo de 70% de cobertura entre proteínas, foram consideradas como candidatas. Baseados nas informações de localização dos genes no NCBI, através da visualização com a ferramenta MapViewer, foram selecionadas seqüências de DNA a 1000 pb (pares de bases) da

região promotora destes genes (região upstream). As regiões promotoras dos genes foram investigadas quanto à abundância de elementos *cis-acting*, através da utilização do programa “Signal Scan Search” do portal “PlantCis-acting Regulatory DNA Elements” (PLACE) (HIGO et al., 1999). Os elementos *cis-acting* encontrados nos promotores foram submetidos a uma análise estatística (cálculo do teste z), com a hipótese que os elementos encontrados possuem função biológica e não apresentam uma distribuição ao acaso no genoma.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a análise de similaridade entre genes de *Arabidopsis* e arroz, foram identificados seis genes da família *Argonauta* (Tab.1).

Tabela 1- Genes estudados, cromossomo em que se encontram, localização no cromossomo, tamanho e número de exons de genes de arroz similares aos de *Arabidopsis thaliana*.

Gene	Cromossomo	Localização (pb)	Tamanho (pb)	Exons
<i>ago1</i>	2	27360225-27348668	11.557	23
<i>ago2</i>	4	31273104-31277349	4.245	3
<i>ago3</i>	4	3539549-3532133	7.416	22
<i>ago4</i>	3	33166818-33158131	8.687	23
<i>ago5</i>	7	9500265-9492708	7.557	11
<i>ago6</i>	3	19050105-19054171	4.006	3

O resultado prévio de ocorrência dos elementos *cis-acting* nos promotores estudados demonstrou 160 diferentes desses elementos, descritos no portal PLACE. Porém, 96 destes (33%), foram identificados com ocorrência significativa no genoma, após a análise com o teste z (Tab.2). A média de ocorrência de elementos *cis-acting* foi de 23, e em média, 11 diferentes elementos *cis-acting* foram encontrados por locos. Dentre os promotores, o *ago5* foi o que apresentou um maior número de elementos encontrados (43), já no loco *ago6* foram encontrados apenas 12 elementos. O número de elementos *cis-acting* por loco juntamente com a ocorrência total dos diferentes elementos, indicam que existe uma grande quantidade e diversidade de elementos *cis-acting* presentes nas regiões promotoras desses genes.

Tabela 2-Promotores dos genes do genoma de arroz, quantidade de elementos, número de diferentes elementos por loco, número médio de cada elemento.

Loco	Quantidades de elementos *	Diferentes elementos por loco	Número médio de cada elemento por loco
<i>ago1</i>	17	10	1,7
<i>ago2</i>	14	10	1,4
<i>ago3</i>	31	14	2,2
<i>ago4</i>	18	12	1,5
<i>ago5</i>	43	11	3,9
<i>ago6</i>	12	9	1,3

* Significativo a 5 %

Os promotores que apresentaram o maior número de diferentes elementos *cis-acting*, não necessariamente foram os mesmos que revelaram as maiores

ocorrências totais, demonstrando que alguns elementos apresentaram maior ocorrência do que outros. Como é o caso do elemento CAATBOX1, com uma alta ocorrência no gene *ago6*, que segundo Shirsat et al., 1989, que regula a atividade do gene *legumin* que em ervilha é responsável pelo enchimento de grão, assim como o EBOXBNNAPA que foi identificado como responsável pela regulação do gene *napA* que atua no armazenamento de proteína no grão em canola (STALBERG et al., 1996). No promotor do loco *ago3* dois elementos (NODCON1GM e OSE1ROOTNODULE) foram previamente identificados em promotores de genes de soja e fava, e atuam em nódulos de raízes infectadas por bactérias fixadoras de nitrogênio (SANDAL et al; 1987; FEHLBERG et al., 2005). Esses dados são um indicativo que o gene *ago6* participa do enchimento de grãos e o *ago3* está relacionado com o desenvolvimento radicular em arroz. Porém, além da utilização de futuros algoritmos de bioinformática, é necessária também, a utilização de ferramentas de biotecnologia, como, sequenciamento, clonagem de promotores, transformação genética e análise de expressão gênica para a validação da participação desses elementos na regulação dos genes estudados, bem como a atuação desses genes no fenótipo.

Tabela 3-Elementos com maior ocorrência em cada um dos promotores dos locos estudados.

Loco	Elementos <i>cis-acting</i> (número de ocorrência no locos)
<i>ago1</i>	TAAAGSTKST1 (3)
<i>ago2</i>	EECCRCAH1 (3)
<i>ago3</i>	NODCON1GM (5), OSE1ROOTNODULE (5)
<i>ago4</i>	DPBFCOREDCCDC3 (3), INRNTPSADB (3)
<i>ago5</i>	CAATBOX1 (11), EBOXBNNAPA (8)
<i>ago6</i>	POLASIG1 (3)

4 CONCLUSÃO

Foram encontrados 6 genes *argonautas* em arroz similares aos de *Arabidopsis*.

Um total de 96 diferentes elementos *cis-acting* estão presentes nas regiões promotoras estudadas.

5 REFERÊNCIAS

AZAMBUJA, I. H. V; VERNETTI Jr., F. J; MAGALHÃES Jr., A. M. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. In: GOMES, A. da S.; MAGALHÃES Jr., A. M. de (Eds técnicos). **Arroz Irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

FAO – Food Alimentation Organization: STATISTICS. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>, Acesso em: 12 de julho de 2012.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Central de Informações Agropecuárias**. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>. Acesso em: 12 de julho de 2012.

SORIN, C.; et al. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. **Plant Cell**, v.17, n.5, p.1343–1359, 2005.

STRÄHLE, U.; RASTEGAR, S. Conserved non-coding sequences and transcriptional regulation. **Brain Research Bulletin**, v.75, n.2-4, p.225–230, 2008.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p. 403-410, 1990.

HIGO, K.; YOSHIHIRO, U.; MASAO, I.; TOMOKO, K. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**, v.27,n.1, p. 297-300, 1999.

SHIRSAT, A.; WILFORD, N.; CROY, R.; BOULTER, D. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. **Molecular and General Genetics**, v.215, n.2, p.326-331, 1989.

STALBERG, K.; ELLERSTOM, M.; EZCURRA, I.; ABLOV, S.; RASK, L. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. **Planta**, v.199, n.4, p.515-519, 1996.

FEHLBERG, V.; VIEWEG, M.F.; DOHMANN, E.M.N.; HOHNJEC, N.; PÜHLER, A.; PERLICK, A.M.; KÜSTER, H. The promoter of the leghaemoglobin gene Vflb29: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n. 413, p.799–806, 2005.

SANDAL, N.N.; BOJSEN, K.; MARCKER, K. A. A small family of nodule specific genes from soybean. **Nucleic Acids Research**, v.75, n.4, p.1507-1519, 1987.

HAVECKER, E. R.; WALLBRIDGE, L. M.; HARDCASTLE, T. J.; BUSH, M. S.; KELLY, K. A.; DUNN, R. M.; SCHWACH, F.; DOONAN, J. H.; BAULCOMBE, D. C. The *Arabidopsis* RNA-Directed DNA Methylation Argonautes Functionally Diverge Based on Their Expression and Interaction with Target Loci. **Plant Cell**, tpc.109.072199v, 2010.

MIYASHIMA, S.; HASHIMOTO, T.; NAKAJIMA, K.; ARGONAUTE1 acts in *Arabidopsis* root radial pattern formation independently of the SHR/SCR pathway. **Plant and Cell Physiology**, v.50, n.3, p.626-634, 2009.