

## EXPRESSÃO DO GENE *OsATG18a* EM ARROZ SUBMETIDO À SALINIDADE NO ESTÁDIO REPRODUTIVO

Gabriel Brandão das Chagas; Latóia Eduarda Maltzahn; Flávia Lopes Solari ; Luca Loreto Cyriaco<sup>4</sup>; Leticia Tonelli Bombo<sup>5</sup>; Luciano Carlos da Maia<sup>6</sup>; Antonio Costa de Oliveira<sup>7</sup>; Camila Pegoraro<sup>8</sup>

Palavras-chave: autofagia, estresse abiótico, *Oryza sativa* L., perfil transcricional

### INTRODUÇÃO

A salinidade é uma condição ambiental adversa que afeta a germinação de sementes, o crescimento de plantas e a produtividade de grãos em arroz (*Oryza sativa* L.). Esta espécie é mais sensível à salinidade nos estádios de plântula e reprodutivo. A entrada da água do mar em áreas costeiras, o uso inadequado da irrigação e dos fertilizantes e as condições climáticas são os principais fatores responsáveis pela salinidade do solo de cultivo de arroz (SINGH et al. 2021, CHEN et al. 2022). Em determinadas regiões do Rio Grande do Sul, estado responsável pela maior parte do arroz produzido no Brasil, a Laguna dos Patos é utilizada como fonte de irrigação. No verão ocorre a salinização da Laguna devido à entrada da água de Oceano Atlântico. A utilização de água com elevados teores de sais é prejudicial à cultura (FRAGA et al. 2010), que se encontra no estágio reprodutivo. Além disso, contribui com a deposição de sais no solo, o que vai afetar as safras futuras.

O desenvolvimento de cultivares de arroz tolerantes é uma das abordagens mais econômicas para lidar com o estresse salino (CHEN et al. 2022). Nos últimos anos diferentes abordagens de biotecnologia tem auxiliado o melhoramento convencional no desenvolvimento de novas cultivares. Dentre essas estratégias está a identificação de genes candidatos envolvidos no controle de caracteres de interesse agrônômico, como a tolerância a salinidade.

As plantas desenvolveram mecanismos aprimorados para manter a homeostase celular durante o desenvolvimento e sob condições ambientais adversas. A autofagia é um dos principais mecanismos de regulação da homeostase, sendo responsável pela degradação e reciclagem de proteínas e organelas. A autofagia atua em condições normais de modo basal, como sistema de limpeza e remobilização de nutrientes. Sob condições adversas é responsável pela reciclagem de componentes celulares danificados ou indesejados. Foram caracterizados diferentes tipos de autofagia em plantas, como microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Na macroautofagia, vesículas (fagóforo) carregam componentes citoplasmáticos para o vacúolo, e com o rompimento da membrana ocorre liberação e hidrólise dessas moléculas, que são recicladas e retornam para o citoplasma (GOU et al. 2019). Os diferentes genes relacionados a autofagia (ATG) foram descobertos em leveduras, e posteriormente foram identificados em plantas e demais eucariotos (CHEN et al. 2021).

Em arroz foram identificados 33 genes ATG (XIA et al. 2011)., pertencentes a diferentes famílias, que codificam proteínas que atuam na indução do fagóforo, transporte de lipídeos para membrana, nucleação de vesículas, e expansão e fechamento do fagóforo (SIGNORELLI et al. 2019). Dentre esses genes está o ATG18, um dos responsáveis pela formação do autofagossomo e expansão do fagóforo via transporte de lipídeos, com seis homólogos em arroz (*OsATG18a-f*). Em *Arabidopsis* o gene *AtATG18a* está envolvido na resposta aos estresses oxidativo, salino e seca (QUEZADA-RODRÍGUEZ et al. 2021).

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil transcricional do gene *OsATG18a* em arroz submetido à salinidade no estágio reprodutivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo foi utilizada a cultivar BRS Pampeira, cultivada em baldes, mantidos em casa de vegetação. As plantas foram conduzidas usando sistema irrigado por inundação, e o manejo foi realizado de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (SOSBAI, 2018). O estresse salino foi aplicado quando as plantas atingiram o estágio R2 (formação do colar da folha bandeira/emborrachamento) (COUNCE et al. 2000). Nesse momento, a lâmina d'água foi substituída por solução de NaCl 150mM (LEKKLAR et al. 2019). Plantas controle permaneceram com lâmina d'água. A coleta de folhas foi feita 0, 3 e 6 dias após o início do estresse. O desenho experimental foi de blocos ao acaso, com três repetições, sendo cada repetição formada por um balde com três plantas.

Os tecidos coletados foram imediatamente fixados em N líquido e armazenados em ultrafreezer a -80 °C. A extração de RNA foi feita usando reagente PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante. Após verificar quantidade e pureza em espectrofotômetro (NanoVue™ Plus Spectrophotometer) e integridade em eletroforese em gel de agarose, 1 µg de cada amostras de RNA foi submetida à digestão de DNAs contaminantes com o kit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen™). Posteriormente, foi feita a síntese de cDNA usando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™).

A sequência correspondente a região codificadora do gene *OsATG18a* (Os02g0791800) foi obtida no banco de dados RAP-BD (*Rice Annotation Project Database* - <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>). Os oligonucleotídeos (F: AGATGCTCACGAGTCTCCCT e R: CCAGAAGCTGTTGCCAGGTA) foram desenhados usando programa *Primer3Plus* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER et al. 2007). Foram utilizados dois genes normalizadores, AK059783 e *Os06g0215200*, previamente testados em estudos anteriores por Jain et al. (2006) e Narsai et al. (2010). A validação dos oligonucleotídeos, para determinar eficiência e especificidade, foi feita usando fator de diluição 1:5, com quatro pontos, a partir de um pool de cDNAs de todos os tratamentos. A análise de expressão foi realizada em equipamento de PCR em tempo real (Applied Biosystems™, modelo 7500 Fast), usando o kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). Para cada repetição biológica foram feitas três repetições técnicas. A quantificação da expressão foi calculada de acordo com a método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os resultados obtidos foram apresentados em gráficos de barra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de expressão do gene *OsATG18a* foi feita em diferentes períodos de estresse salino e também em diferentes períodos na condição controle, já que é sabido que a autofagia também está envolvida no desenvolvimento das plantas (CHEN et al. 2021). Em condições normais (controle), foi observado um aumento de expressão do gene *OsATG18a* com o avanço do estágio reprodutivo (Figura 1). Quando se considera a condição de salinidade, se verifica maior acúmulo de transcritos de *OsATG18a* em 3 dias após início do estresse, e redução da expressão desse gene aos 6 dias de estresse. Esse comportamento sugere o envolvimento de *OsATG18a* na resposta inicial à salinidade em arroz. Resultados similares foram obtidos em *Arabidopsis*, arroz, trigo, tabaco, pimenta e outras espécies modelo, nas quais o tratamento com NaCl promoveu a indução da transcrição de genes *ATG*, especialmente *AtATG8* e *AtATG18* (LUO et al. 2017).

Em estudos anteriores, Liu et al. (2009) também verificaram aumento da expressão de *AtATG18a* em plantas de *Arabidopsis* sob estresse salino. Os autores também demonstraram que o silenciamento de *AtATG18a* leva a maior sensibilidade das plantas, sugerindo que a autofagia está envolvida na sobrevivência das plantas durante a exposição à salinidade. Além disso, os autores sugerem que o gene *AtATG18a* pode ser utilizado como um marcador para prever a atividade de autofagia.

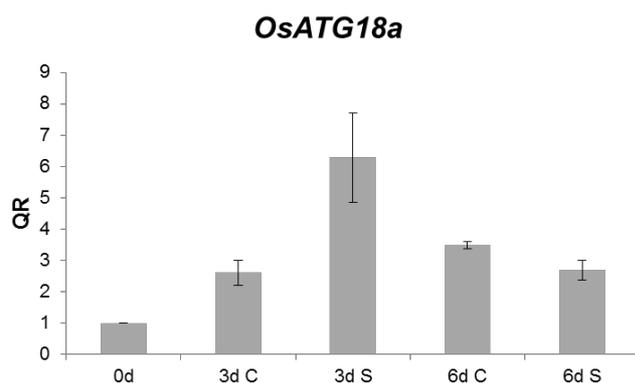


Figura 1. Perfil de expressão do gene *OsATG18* em plantas de arroz submetidas à salinidade (NaCl 150mM) no estágio R2 (emborrachamento). QR: quantificação relativa; 0d: plantas em R2; 3d C: plantas 3 dias após R2 com manutenção de lâmina d'água; 3d S: plantas 3 dias após R2 com estabelecimento de lâmina de solução salina; 6d C: plantas 6 dias após R2 com manutenção de lâmina d'água; 6d S: plantas 6 dias após R2 com estabelecimento lâmina de solução salina. Os intervalos representam o erro padrão.

É conhecido que sob salinidade ocorre a inibição da absorção de água pelas plantas, e o acúmulo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no citosol causa toxicidade iônica. Como consequência tem-se a redução da fotossíntese e a elevação de espécies reativas de oxigênio. Para lidar com o estresse osmótico e iônico as plantas fecham os estômatos e limitam a concentração de  $\text{Na}^+$  nas células através da compartimentalização no vacúolo. Além disso, ocorre a síntese de osmólitos como glicinabetaína, álcoois de açúcar, poliaminas e prolina. Embora esses mecanismos já sejam bem compreendidos, há pouca informação com relação à forma de manutenção de energia e realocação de recursos sob salinidade. Foi demonstrado que a autofagia, além de atuar na reciclagem de proteínas e organelas danificadas, fornecendo energia e macromoléculas para a sobrevivência da planta, também é requerida para o sequestro de  $\text{Na}^+$  no vacúolo de células da raiz (LUO et al. 2017). Considerando que autofagia é induzida na condição de salinidade e está envolvida nos mecanismos de adaptação, sugere-se explorar essa rota como uma estratégia de melhoramento para obtenção de cultivares de arroz tolerantes à salinidade.

## CONCLUSÃO

O gene *OsATG18a* foi induzido em plantas de arroz submetidas à salinidade no estágio reprodutivo. Estudos com *OsATG18a* e outros genes envolvidos na rota da autofagia pode ser uma estratégia potencial para o desenvolvimento de cultivares de arroz tolerantes ao estresse ocasionado por salinidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, H.; DONG, J.; WANG, T. Autophagy in Plant Abiotic Stress Management. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 4075. 2021.
- CHEN, G.; HU, K.; ZHAO, J.; GUO, F.; SHAN, W.; JIANG, Q.; ZHANG, J.; GUO, Z.; FENG, Z.; CHEN, Z.; WU, X.; ZHANG, S.; ZUO, S. Genome-Wide Association Analysis for Salt-Induced Phenotypic and Physiologic Responses in Rice at Seedling and Reproductive Stages. **Frontiers in Plant Science**. v. 13, n. 822618. 2022.
- COUNCE, P.A.; KEISLING, T.C.; MITCHELL, A.J. A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. **Crop Science**, v. 40, p. 436-443. 2000.
- FRAGA, T.I.; CARMONA, F.C.; ANGHINONI, I.; GENRO JUNIOR, S.A. Flooded rice yield as affected by levels of water salinity in different stages of its cycle. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 34(1), p. 175-182. 2010.
- GOU, W.; LI, X.; GUO, S.; LIU, Y.; LI, F.; XIE, Q. Autophagy in Plant: A new orchestrator in the regulation of the phytohormones homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20, n. 2900. 2019.
- JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 345, p. 646-651. 2006.
- LEKKLAR, C.; PONGPANICH, M.; SURIYA-ARUNROJ, D.; CHINPONGPANICH, A.; TSAI, H.; COMAI, L.; CHADCHAWAN, S.; BUABOOCHA, T. Genome-wide association study for salinity tolerance at the flowering stage in a panel of rice accessions from Thailand. **BMC Genomics**. v.20, n. 76. 2019.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**. v. 25, p. 402-408. 2001.
- LIU, Y.; XIONG, Y.; BASSHAM, D.C. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. **Autophagy**. v. 5:7, p. 954-963. 2009.
- LUO, L.; ZHANG, P.; ZHU, R.; FU, J.; SU, J.; ZHENG, J.; WANG, Z.; WANG, D.; GONG, Q. Autophagy Is Rapidly Induced by Salt Stress and Is Required for Salt Tolerance in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**. v. 8, n. 1459. 2017.
- NARSAI, R.; IVANOVA, A.; NG, S.; WHELAN, J. Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. **BMC Plant Biology**. v. 10, n. 56. 2010.
- QUEZADA-RODRÍGUEZ, E.-H.; GÓMEZ-VELASCO, H.; ARTHIKALA, M.-K.; LARA, M.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, A.; NANJAREDDY, K. Exploration of Autophagy Families in Legumes and Dissection of the ATG18 Family with a Special Focus on *Phaseolus vulgaris*. **Plants**. v. 10, n. 2619. 2021.
- SIGNORELLI, S.; TARKOWSKI, Ł.P.; VAN DEN ENDE, W.; BASSHAM, D.C. Linking autophagy to abiotic and biotic stress responses. **Trends in Plant Science**. v. 24, p. 413-430. 2019.
- SINGH, R.K.; KOTA, S.; FLOWERS, T.J. Salt tolerance in rice: seedling and reproductive stage QTL mapping come of age. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 134, p. 3495-3533. 2021.
- SOSBAI, 2018. Arroz Irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado, Cachoeirinha, RS, Brasil.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**. v. 35, p. 71-74. 2007.
- XIA, K.; LIU, T.; OUYANG, J.; WANG, R.; FAN, T.; ZHANG, M. Genome wide identification, classification, and expression analysis of autophagy - Associated gene homologues in rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research**. v. 18, p. 363-377. 2011.