

PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE *OsATG3a* EM ARROZ SUBMETIDO À SALINIDADE

**SABRINA SPIERING PASSOS¹; LATÓIA EDUARDA MALTZAHN²; FLÁVIA
LOPES SOLARI³; LETICIA TONELLI BOMBO⁴, CAMILA PEGORARO⁵, LUCIANO
CARLOS DA MAIA⁶**

¹ Universidade Federal de Pelotas – binaspiering@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – latoiaeduarda@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – flavialopessolari@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – bombo.leticia28@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – lucianoc.maia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Tem sido reportado que um terço das terras cultiváveis do mundo são afetadas pela salinidade. Dentre as causas da salinização do solo estão as práticas inadequadas de irrigação e a inundação do solo com água contendo elevados níveis de sais nas regiões costeiras. No Brasil, a salinidade abrange cerca de 2% da área de cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). O arroz é sensível à salinidade, principalmente nos estádios de plântula e reprodutivo, o que resulta em uma drástica redução da produtividade (SOUZA-LEMES et al. 2016; TABASSUM et al. 2021).

A alta concentração de NaCl inibe a captação de água pelas plantas, e o acúmulo de Na⁺ e Cl⁻ no citosol leva a toxicidade iônica. Como resultado a taxa fotossintética é reduzida, levando a perda de energia e acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio. Para lidar com os estresses osmóticos e iônicos, as plantas fecham os estômatos para minimizar a perda de água, reduzem o crescimento, e limitam a concentração intracelular de Na⁺ através da compartimentalização no vacúolo. Além disso, o Na⁺ é realocado para folhas velhas, e as plantas podem entrar em uma fase de recuperação do crescimento a uma taxa constante e reduzida. Adicionalmente, foi revelado que osmólitos como glicinabetaína, álcoois de açúcar, poliaminas e prolina estão associados com a tolerância à salinidade (LUO et al. 2017). Ainda, foi demonstrado que o mecanismo de autofagia também está envolvido na tolerância ao estresse salino (SU et al. 2020).

A autofagia é um mecanismo de degradação e reciclagem de organelas e proteínas, altamente conservado, e que atua durante crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses. Esse processo pode ocorrer por meio de vesículas que englobam componentes citoplasmáticos prejudiciais ou indesejados, transportando-os para o vacúolo para degradação e reciclagem. Além disso, o vacúolo pode englobar diretamente esses componentes, sem o intermédio de vesículas. Inúmeros genes associados à autofagia (ATG) estão envolvidos nesse processo, atuando de forma coordenada (SU et al. 2020).

Entender os mecanismos moleculares por trás da tolerância à salinidade é fundamental para melhorar a produtividade de arroz sob essa condição. A tolerância ao estresse salino é uma característica quantitativa, controlada por múltiplos genes. Nos últimos anos, vários genes que conferem tolerância ao estresse salino em plantas foram identificados, os quais estão envolvidos na transdução de sinais, regulação da transcrição e no transporte de íons (KUMAR et al. 2013). Porém, há poucos estudos que elucidam o envolvimento dos genes

relacionados à autofagia (ATG) com a tolerância a salinidade em arroz. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de expressão do gene OsATG3a em plantas de arroz submetidas ao estresse salino durante o estádio reprodutivo.

2. METODOLOGIA

A expressão dos gene OsATG3a foi analisada em folhas de arroz da cultivar BRS Pampeira submetida à salinidade no estádio reprodutivo. As plantas foram cultivadas em baldes, e mantidas em casa de vegetação.

Quando as plantas atingiram o estádio R2, formação do colar da folha bandeira/emborrachamento (COUNCE et al. 2000), foram submetidas ao estresse salino. Para isso, a lâmina d'água foi substituída por solução de NaCl 150mM (LEKKLAR et al. 2019). Plantas da condição controle permaneceram com lâmina d'água. Foram coletadas folhas 0, 3 e 6 dias após R2, tanto de plantas mantidas com lâmina d'água (controle), quanto de plantas sumetidas à salinidade. Os tratos culturais e o manejo fitossanitário foram feitos de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (SOSBAI, 2018). Utilizou-se delineamento de blocos ao acaso, com três repetições, sendo cada repetição formada por um balde com três plantas.

Para obtenção de RNA foi utilizado o reagente PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade e a pureza do RNA foi analisada em espectrofotômetro (NanoVue™ Plus Spectrophotometer) e a integridade em eletroforese em gel de agarose. Posteriormente, 1 µg de cada amostras de RNA foi submetida à digestão de DNAs contaminantes com o kit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen™). Em seguida a síntese de cDNA foi feita usando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™).

Foi acessado o banco de dados RAP-BD (*Rice Annotation Project Database* - <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) para obter a sequência da região codificadora do gene OsATG3a (Os01g0200000). Para o desenho dos iniciadores (F: CCCTTGTACGCTTCGTCTTC e R: ACCTTCTGCTTCACCTGCAT) foi utilizado o programa *Primer3Plus* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER et al. 2007). Os genes AK059783 e Os06g0215200, previamente testados em estudos anteriores (JAIN et al. 2006; NARSAI et al. 2010), foram selecionados como normalizadores. Para determinar a eficiência e a especificidade dos iniciadores, foi utilizado um fator de diluição 1:5, com quatro pontos, a partir de um pool de cDNAs. A análise de expressão foi feita usando o kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), em equipamento de PCR em tempo real (Applied Biosystems™, modelo 7500 Fast). Para cada repetição biológica foram feitas três repetições técnicas. O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para os cálculos de quantificação relativa da expressão. Os resultados foram apresentados em gráficos de barra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene OsATG3a codifica uma das proteínas chave envolvida no processo de autofagia (LUO et al. 2017). Para determinar se alterações da expressão do gene OsATG3a eram decorrentes do estresse salino ou da idade da planta, foram feitas coletas em ambas condições, controle e estresse. De fato, foi possível observar que na condição controle houve alteração na expressão do gene de

acordo com o avanço do estádio reprodutivo (Figura 1). A autofagia atua de modo basal e pode ser rapidamente induzida pela privação de nutrientes, estádio de desenvolvimento e condições estressantes (LUO et al. 2017; SU et al. 2020).

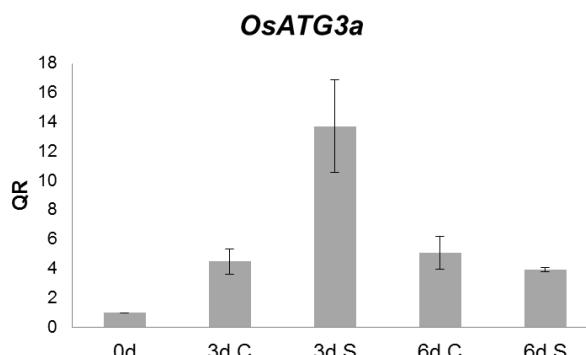


Figura 1. Expressão do gene OsATG3a em arroz da cultivar BRS Pampeira submetida à salinidade (NaCl 150mM) no estádio R2. QR: quantificação relativa; 0d: R2 (imediatamente antes da indução do estresse salino); 3d C: 3 dias após R2 no controle; 3d S: 3 dias após R2 na salinidade; 6d C: 6 dias após R2 no controle; 6d S: 6 dias após R2 na salinidade. Os intervalos representam o erro padrão.

Quando a condição de salinidade é considerada, verifica-se maior acúmulo de transcritos do gene OsATG3a após três dias de estresse. Aos seis dias sob salinidade, a expressão é similar à condição controle nesse período (Figura 1). Ao que parece, esse gene é regulado na fase inicial do estresse. A associação de diferentes genes ATG com a resposta e tolerância à salinidade já foi demonstrada em arroz, Arabidopsis, trigo, tabaco, pimenta e outras espécies modelo (LUO et al. 2017). Nesse estudo fica evidente o envolvimento de OsATG3a na resposta ao estresse salino em arroz.

A salinidade quando ocorre no estádio reprodutivo ocasiona a esterilidade de espiguetas (SINGH et al. 2021), reduzindo a produtividade do arroz. A manipulação de genes OsATG, especialmente OsATG3a, parece uma boa estratégia para auxiliar o desenvolvimento de genótipos tolerantes. Isso porque, além da autofagia estar envolvida na resposta e tolerância a estresses (SU et al. 2020), também é necessária para regulação metabólica e fornecimento de nutrientes nas anteras, além da degradação dentro das células do tapete para o desenvolvimento das anteras após a meiose (YANG et al. 2021).

4. CONCLUSÕES

O gene OsATG3a tem sua expressão aumentada em folhas de plantas de arroz submetidas à salinidade no estádio reprodutivo. Aparentemente, OsATG3a está envolvido na resposta ao estresse salino, podendo ser alvo do melhoramento de plantas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.

KUMAR, K.; KUMAR, M.; KIM, SR.; RYU, H.; CHO, Y-G. Insights into genomics of salt stress response in rice. **Rice.** v. 6, n. 27. 2013.

KURUSU et al. OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. **Autophagy.** v. 10(5), p. 878-88. 2014.

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.

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.

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.

SOUZA-LEMES, E.; DE OLIVEIRA, S.; TAVARES, L.C.; MENDONÇA, A.O.; DIAS-LEITZKE, I.; MENEGHELLO, G.E.; BARROS, A.C.S.A. Productivity and physiological quality of irrigated rice seeds under salt stress and carbonized rice husk ashes fertilization. **Agrociencia.** v. 50(3), p. 307-321. 2016.

SU, W.; BAO, Y.; YU, X.; XIA, X.; LIU, C.; YIN, W. Autophagy and Its Regulators in Response to Stress in Plants. **International Journal of Molecular Science.** v. 21(23), n.8889. 2020.

TABASSUM, R.; ARIF, M.T-U.; HASANUZZAMAN, M.; SOHAG, A.A.M.; ISLAM, M.S.; SHAFI, S.M.S.H.; ISLAM, M.M.; HASSAN, L. Screening salt-tolerant rice at the seedling and reproductive stages: An effective and reliable approach. **Environmental and Experimental Botany.** v. 192, n. 104629. 2021.

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.