

EXPRESSÃO DE GENES *OsATG* EM PLÂNTULAS DE ARROZ SUBMETIDAS AO FRIO DURANTE A GERMINAÇÃO

SILVANA ALVES ROSA¹; VIVIANE KOPP DA LUZ²; LUCIANO CARLOS DA MAIA³; CAMILA PEGORARO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – rosasilvana2@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – vivikp05@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – lucianoc.maia@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das culturas alimentares mais importante do mundo, e é adaptado ao clima tropical. A ocorrência de frio restringe severamente a produção de arroz. Uma germinação rápida e uniforme, e o crescimento vigoroso das plântulas são essenciais para o estabelecimento da lavoura. No entanto, o estresse ocasionado pelo frio geralmente danifica e atrasa a germinação e o crescimento das plântulas de arroz, levando ao estabelecimento de estandes inferiores e maturidade desigual (YANG et al. 2021). No Rio Grande do Sul, principal estado produtor de arroz do Brasil, são utilizadas cultivares da subespécie *indica* (sensíveis ao frio), e a semeadura ocorre nos meses de outubro e novembro, que tem como temperatura média 15°C (CRUZ et al. 2006), o que pode impactar a fase inicial de estabelecimento e desenvolvimento das plântulas.

Em condições normais o metabolismo celular produz baixas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) como $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , O_2^- e $\text{HO}^\cdot$, porém em condições adversas como o frio, a produção de EROs é extremamente elevada. EROs podem desempenhar um papel importante na sinalização para percepção do estresse e proteção, no entanto, em níveis elevados são moléculas tóxicas capazes de causar dano oxidativo em proteínas, DNA e lipídeos. A detoxificação de EROs é feita através de moléculas antioxidantes como ácido ascórbico e glutathione e de enzimas como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), e peroxiredoxina (PrxR) (SUZUKI; MITTLER 2006). Quando o sistema antioxidante é insuficiente, os componentes celulares danificados pelas EROs podem ser reciclados pelo mecanismo de autofagia.

A autofagia é encarregada da degradação e reciclagem de componentes celulares danificados no vacúolo, e está associada com a tolerância a estresses bióticos e abióticos em diferentes espécies vegetais (SIGNORELLI et al., 2019). Foram identificados três tipos de autofagia, a microautofagia (componentes citoplasmáticos na superfície do vacúolo), a macroautofagia (materiais a serem degradados ficam em vesículas citoplasmáticas, provenientes de um fagóforo que gera autofagossomo) e a mega-autofagia (degradação de todo conteúdo citoplasmático). Mais de 30 genes *ATG* (*autophagy related genes*) são necessários para que a macroautofagia ocorra (MARSHALL; VIERSTRA 2018). Em um estudo desenvolvido por CHEN et al. (2021), várias pesquisas que relacionam os genes *ATG* com a resposta e tolerância a estresses abióticos em plantas são relatadas.

Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de genes *OsATG* em plântulas de arroz germinadas em condições de frio.

2. METODOLOGIA

A identificação dos genes *OsATG* foi feita no banco de dados RAP-DB (*The Rice Annotation Project* - <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) (Tabela 1). O ID de cada gene foi utilizado para busca do perfil de expressão em um conjunto de dados de RNASeq (MAIA et al. 2017). O acúmulo de transcritos dos genes *OsATG* é apresentado em *log2 fold change*, em *heat map*, construído utilizando o programa *Multi Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003).

Para obtenção do perfil transcricional foi utilizada a parte aérea de plântulas das cultivares Tio Taka (subespécie *indica* – sensível ao frio na germinação) e Oro (subespécie *japonica* – tolerante ao frio na germinação) em estágio S₃ (ponto de agulha). Para germinação as sementes foram acondicionadas em caixas plásticas com papel de germinação umedecido com água 2,5x seu peso, e mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro) a 25°C ±2°C (controle) e a 13°C ±2°C (frio) (MAIA et al. 2017; VIANA et al. 2021).

Os procedimentos de extração de RNA, análise de expressão gênica via RNASeq e análises de bioinformática são descritos detalhadamente em MAIA et al. (2017) e VIANA et al. (2021).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em arroz foram identificados 31 genes *OsATGs* (Tabela 1), e alguns desses genes apresentam transcritos alternativos. Um número parecido de genes *OsATG* já havia sido detectado no genoma do arroz por XIA et al. (2011). O *splicing* alternativo, processo detectado em alguns genes *OsATG* é um mecanismo molecular que produz múltiplas proteínas a partir de um único gene em células eucariotas (JO; CHOI 2015). Esse mecanismo é importante para adaptação de plantas aos diferentes ambientes e tem impacto no processo de melhoramento de plantas (SYED et al. 2012).

Tabela 1. Genes *OsATG* presentes em arroz.

Nome	ID RAP-DB	Nome	ID RAP-DB	Nome	ID RAP-DB
<i>OsATG1a</i>	Os03t0268200-01	<i>OsATG6b</i>	Os03t0644000-01	<i>OsATG12</i>	Os06t0205000-01
	Os03t0268200-02	<i>OsATG6c</i>	Os03t0258500-00	<i>OsATG13a</i>	Os02t0644500-01
	Os03t0268200-03	<i>OsATG7</i>	Os01t0614900-01	<i>OsATG13b</i>	Os04t0538700-01
	Os03t0268200-04		Os01t0614900-02		Os04t0538700-02
	Os03t0268200-05	<i>OsATG8a</i>	Os07t0512200-01	<i>OsATG16</i>	Os09t0497700-01
<i>OsATG1b</i>	Os03t0289100-01	<i>OsATG8b</i>	Os04t0624000-01	<i>OsATG18a</i>	Os02t0791800-01
	Os03t0289100-02	<i>OsATG8c</i>	Os08t0191600-01		Os02t0791800-02
<i>OsATG1c</i>	Os08t0484600-01	<i>OsATG8d</i>	Os02t0529150-00	<i>OsATG18b</i>	Os01t0168500-01
<i>OsATG3a</i>	Os01t0200000-01	<i>OsATG8e</i>	Os11t0100100-01	<i>OsATG18c</i>	Os01t0934000-01
<i>OsATG3b</i>	Os10t0560450-01	<i>OsATG9a</i>	Os03t0248000-02		Os01t0934000-02
<i>OsATG4a</i>	Os03t0391000-01		Os03t0248000-03	<i>OsATG18d</i>	Os05t0169200-01
<i>OsATG4b</i>	Os04t0682000-01	<i>OsATG9b</i>	Os10t0163100-01	<i>OsATG18e</i>	Os01t0786900-01
<i>OsATG5</i>	Os02t0117800-01	<i>OsATG10a</i>	Os04t0497350-01	<i>OsATG18f</i>	Os05t0405900-01
<i>OsATG6a</i>	Os01t0681400-01	<i>OsATG10b</i>	Os12t0506800-01		Os05t0405900-02
					Os05t0405900-03

Dos 31 genes *OsATG*, 24 tiveram expressão diferencial na condição de frio em relação ao controle em pelo menos uma das cultivares (Figura 1). Os genes *OsATG1b*, *OsATG1c*, *OsATG3b*, *OsATG6a*, *OsATG9b*, *OsATG10a*, *OsATG10b*, *OsATG12* e *OsATG18f* foram induzidos pelo frio em ambas as cultivares (Figura 1), sugerindo que há dano em constituintes celulares tanto na cultivar sensível quanto na cultivar tolerante ao frio, necessitando de autofagia. A alteração da expressão de genes *ATG* em resposta ao frio já foi verificado em pimenta (ZHAI et al. 2016). Esses resultados sugerem que o mecanismo de autofagia é ativado nessa condição, e pode atuar como uma estratégia para lidar com os danos ocasionados pelo frio.

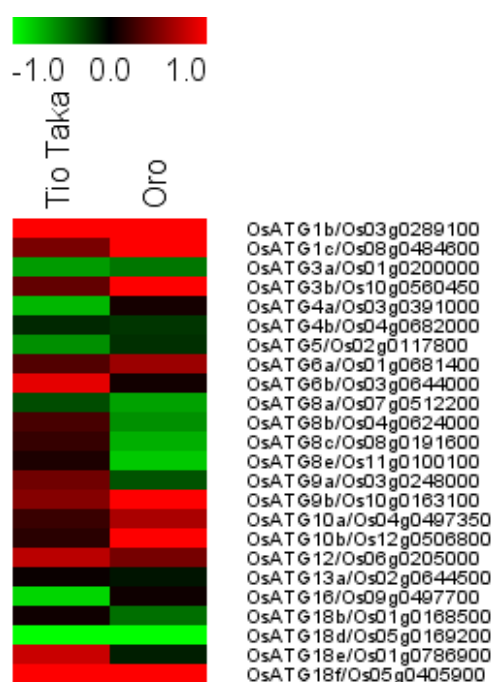


Figura 1. Perfil de expressão de genes *OsATG* em plântulas de arroz no estágio S₃, germinadas na condição frio (13°C). Cultivar Tio Taka (sensível ao frio na germinação) e cultivar Oro (tolerante ao frio na germinação). As cores vermelho e verde indicam aumento e repressão da expressão na condição de frio, respectivamente. A cor preta indica que não houve alteração na expressão.

Na condição de frio os genes *OsATG8b*, *OsATG8c*, *OsATGe*, *OsATG9a* e *OsATG18e* são induzidos na cultivar sensível e reprimidos na cultivar tolerante (Figura 1). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato que na cultivar sensível há maior dano pelo frio, necessitando reciclar maior quantidade de constituintes celulares danificados, por isso maior expressão de alguns genes *OsATG*.

Não foi verificado um padrão de expressão que pudesse indicar que os genes *OsATG* estão associados com a tolerância ao frio na germinação na cultivar Oro.

4. CONCLUSÕES

Genes *OsATG* apresentam expressão diferencial em plântulas de arroz submetidas ao frio na germinação. Entretanto, parece que os genes *OsATG* não estão envolvidos no mecanismo de tolerância ao frio na germinação da cultivar Oro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, H.; DONG, J.; WANG, T. Autophagy in Plant Abiotic Stress Management. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 22, p. 4075 2021.
- CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Rice cold tolerance at the reproductive stage in a controlled environment. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 63, n.3, p. 255-261, 2006.
- JO, B-S.; CHOI, S.S. Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. **Genomics & Informatics**, Seoul, v. 13,4, p. 112-118, 2015.
- MAIA, L.C.; CADORE, P.R.B.; BENITEZ, L.C.; DANIELOWSKI, R.; BRAGA, E.J.B.; FAGUNDES, P.R.R.; MAGALHÃES, A.M.; COSTA DE OLIVEIRA, A. Transcriptome profiling of rice seedlings under cold stress. **Functional Plant Biology**, Melbourne, v. 44, p. 419-429. 2017.
- MARSHALL, R. S.; VIERSTRA, R.D. Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 69, n. 22, p. 22.36, 2018.
- SAEED A.I. et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **BioTechniques**, London, n. 34, p. 374-378. 2003.
- SIGNORELLI, S.; TARKOWSKI, Ł.P.; VAN DEN ENDE, W.; BASSHAM, D.C. Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. **Trends in Plant Science**, Maryland Heights, v. 24, n. 5, p.413-430, 2019.
- SYED, N.H.; KALYNA, M.; MARQUEZ, Y.; BARTA, A.; BROWN, J.W. Alternative splicing in plants--coming of age. **Trends in Plant Science**, Maryland Heights, v. 17(10), p. 616–623. 2012.
- SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 126, p. 45–51, 2006.
- VIANA, V.E.; DA MAIA L.C.; BUSANELLO, C.; PEGORARO, C.; COSTA DE OLIVEIRA, A. When rice gets the chills: comparative transcriptome profiling at germination shows WRKY transcription factor responses. **Plant Biology**, v. 23, p. 100-112, 2021.
- 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**, Oxford, n. 18, p. 363–377, 2011.
- YANG, L.; LEI, L.; LI, P.; WANG, J.; WANG, C.; YANG, F.; CHEN, J.; LIU, H.; ZHENG, H.; XIN, W.; ZOU, D. Identification of Candidate Genes Conferring Cold Tolerance to Rice (*Oryza sativa* L.) at the Bud-Bursting Stage Using Bulk Segregant Analysis Sequencing and Linkage Mapping. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne Heights, v. 12, 647239, 2021.
- ZHAI, Y.; GUO, M.; WANG, H.; LU, J.; LIU, J.; ZHANG, C.; GONG, Z.; LU, M. Autophagy, a Conserved Mechanism for Protein Degradation, Responds to Heat, and Other Abiotic Stresses in *Capsicum annuum* L. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, 131, 2016.