

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**  
**Curso de Biotecnologia**



Trabalho de Conclusão de Curso

**Perfil transcricional de genes *OsATG* em plântulas de arroz sob diferentes estresses abióticos**

**Silvana Alves Rosa**

Pelotas, 2021

**Silvana Alves Rosa**

**Perfil transcricional de genes *OsATG* em plântulas de arroz sob diferentes estresses abióticos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Camila Pegoraro

Pelotas, 2021

R788p Rosa, Silvana Alves

Perfil transcricional de genes *OsATG* em plântulas de arroz sob diferentes estresses abióticos / Silvana Alves Rosa ; Camila Pegoraro, orientadora. – Pelotas, 2021.

23 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Autofagia. 2. Expressão gênica. 3. Frio. 4. *Oryza sativa* L.. 5. Salinidade. I. Pegoraro, Camila, orient. II. Título.

CDD : 633.18

Silvana Alves Rosa

Perfil transcricional de genes *OsATG* em plântulas de arroz sob diferentes estresses abióticos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 11/06/2021

Banca Examinadora:

Prof. Dr<sup>a</sup>. Camila Pegoraro (Orientadora)

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr<sup>a</sup>. Viviane Kopp da Luz

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr<sup>a</sup>. Vívian Ebeling Viana

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais Izelda Alves Rosa e Joacir da Silva Rosa (*in memoriam*) que sempre me incentivaram aos estudos.

À minha irmã Juliana Alves Rosa, ao meu cunhado Carlos Eduardo Nunes Carpe e ao meu sobrinho Caetano Rosa Carpe a todo apoio e suporte.

Ao meu amigo/irmão David de Lima de Souza que sempre me ajudou ao longo do curso.

Aos meus colegas e amigos Amália Alves e Gustavo Camozatto que estiveram sempre ao meu lado durante a graduação.

À minha orientadora professora Dra. Camila Pegoraro pela paciência, ensinamentos e dedicação

E aos colegas e amigos do Centro Genômica e Fitomelhoramento pela ajuda e amizade.

À coordenação e aos professores do curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas por serem tão atenciosos e dedicados.

À FAPERGS pela concessão da bolsa.

Obrigada.

## Resumo

ROSA, Silvana Alves. **Perfil transcricional de genes *OsATG* em plântulas de arroz sob diferentes estresses abióticos**. Orientadora: Camila Pegoraro. 2021. 23 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021

Por ser um dos alimentos mais importantes do mundo, há um constante aumento na demanda de arroz, que tem sua produtividade ameaçada pela ocorrência de estresses abióticos, que vem se intensificando ao longo dos anos. No Rio Grande do Sul, principal estado produtor de arroz do Brasil, a ocorrência de fatores abióticos como submergência das plântulas, salinidade e frio podem impactar negativamente a produtividade da cultura. Além disso, em outras áreas do Brasil, assim como do mundo, a produtividade de arroz pode ser limitada pela ocorrência de seca. O desenvolvimento de cultivares tolerantes é uma estratégia potencial para minimizar os danos causados por estresses abióticos. No entanto, a tolerância a estresses abióticos é uma característica complexa, dificultando o processo de melhoramento convencional. Por isso ferramentas de engenharia genética como transgenia e edição de genomas podem auxiliar o processo de melhoramento. Porém, para que essa abordagem seja utilizada é necessário a identificação de genes candidatos associados com a tolerância a estresses. Inúmeros genes envolvidos com tolerância a condições adversas têm sido identificados e caracterizados. Nos últimos anos foi demonstrada a participação de genes envolvidos no processo de autofagia (*ATG- autophagy related genes*) na tolerância das plantas a diferentes estresses abióticos. Porém, em arroz poucos estudos foram desenvolvidos com esses genes. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo analisar o perfil transcricional de genes *OsATG* em plântulas de arroz submetidas aos estresses por submergência, salinidade, seca e frio. A maioria dos genes *OsATG* foram induzidos quando as plântulas foram submetidas aos diferentes estresses, indicando seu envolvimento nos mecanismos de resposta. Esse estudo demonstra que genes *OsATG* são candidatos para tolerância a estresses abióticos em arroz.

**Palavras-chave:** Autofagia. Expressão gênica. Frio. *Oryza sativa L.* Salinidade. Seca. Submergência.

## Abstract

ROSA, Silvana Alves. **Transcriptional profile of OsATG genes in rice seedlings under different abiotic stresses**. Advisor: Camila Pegoraro. 2021. 23 f. Course Completion Paper - Technological Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021

As one of the most important foods in the world, there is a constant increase in the demand for rice, whose productivity is threatened by the occurrence of abiotic stresses, which have been intensifying over the years. In Rio Grande do Sul, the main rice-producing state in Brazil, the occurrence of abiotic factors such as seedling submergence, salinity and cold can negatively impact crop yield. Furthermore, in other areas of Brazil, as well as the world, rice productivity may be limited by the occurrence of drought. The development of tolerant cultivars is a potential strategy to minimize damage caused by abiotic stresses. However, tolerance to abiotic stresses is a complex characteristic, hindering the conventional breeding process. Therefore, genetic engineering tools such as transgenics and genome editing can help the improvement process. However, for this approach to be used it is necessary to identify candidate genes associated with stress tolerance. Numerous genes involved in tolerance to adverse conditions have been identified and characterized. In recent years, the participation of genes involved in the autophagy process (ATG- *autophagy related genes*) in plant tolerance to different abiotic stresses has been demonstrated. However, in few studies were developed with these genes. Thus, this study aimed to analyze the transcriptional profile of OsATG genes in rice seedlings subjected to submergence, salinity, drought and cold stresses. Most OsATG genes were induced when seedlings were subjected to different stresses, indicating their involvement in response mechanisms. This study demonstrates that OsATG genes are candidates for tolerance to abiotic stresses in rice.

**Keywords:** Autophagy. Gene expression. Cold, *Oryza sativa* L. Salinity. Drought, Submergence.

## Lista de Figuras

- Figura 1 Perfil transcricional de genes *OsATG* em parte aérea e raiz de plântulas de arroz submetidas a submergência.....16
- Figura 2 Perfil transcricional de genes *OsATG* em parte aérea e raiz de plântulas de arroz submetidas a salinidade..... 17
- Figura 3 Perfil transcricional de genes *OsATG* em parte aérea e raiz de plântulas de arroz submetidas a seca.....18
- Figura 4 Perfil transcricional de genes *OsATG* em parte aérea e raiz de plântulas de arroz submetidas ao frio..... .....19



## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>19</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>20</b>

## 1 Introdução

Condições ambientais adversas como frio, deficiência ou excesso de água e salinidade afetam o crescimento e desenvolvimento de plantas, levando a redução da produtividade (HE et al., 2018). O arroz (*Oryza sativa* L.), alimento básico para metade da população mundial, é altamente suscetível a estresses abióticos (MELO et al., 2021), o que pode ameaçar a segurança alimentar.

No Brasil o arroz é cultivado utilizando o sistema irrigado por inundação (ecossistema de várzea), o qual é predominante na região Sul, responsável pela maior parte de arroz produzido no país. Uma pequena fração do arroz é produzido na região Central, utilizando o sistema de sequeiro (ecossistema terras altas), que depende de chuvas ou irrigação por aspersão. O cultivo de arroz no Rio Grande do Sul (RS), principal estado produtor do país, enfrenta algumas condições adversas, características do estado.

No RS, após a emergência das plântulas de arroz e estabelecimento de lâmina de água, pode ocorrer períodos com alta intensidade de chuvas, ocasionando a submergência das plântulas (ambiente anaeróbico). Esse estresse abiótico tem maior impacto no Sul e Sudeste Asiático, na estação das monções (PANDA; BARIK, 2021). Embora o arroz tenha capacidade de desenvolver aerênquimas, que permite a oxigenação das raízes sob condição de lâmina d'água (PANDA; BARIK, 2021), muitas cultivares, inclusive as utilizadas no RS, são sensíveis quando estão completamente submersas por períodos prolongados. Nesses genótipos ocorre o alongamento das folhas e caule para alcançar o ar disponível acima do nível da água, entretanto, esse alongamento ocasiona um gasto muito elevado de energia, exaurindo as reservas das plantas, podendo leva-las a morte quando o nível de água é muito elevado e o período de submergência for longo (revisado por NISHIUCHI et al., 2012). Por outro lado, genótipos tolerantes apresentam duas estratégias para sobreviver à essa condição adversa. Na estratégia de queiscência (genótipos que apresentam o alelo *Submergence1A-1 – Sub1A-1*), ocorre a paralização do crescimento quando a planta está submersa, e com isso economiza energia para retomar o crescimento quando o nível da água baixar. Na estratégia de escape (arroz de águas profundas com os alelos *Snorkel – SK1* e *SK2*), ocorre o alongamento rápido dos entrenós para planta ficar acima do nível da água (revisado por NISHIUCHI et al., 2012; PANDA; BARIK, 2021).

A água utilizada para irrigação em algumas áreas do RS, principalmente as pertencentes a região denominada Planície Costeira, é proveniente da Laguna dos Patos. Em meses mais quentes, com baixa precipitação e elevada demanda de água pela cultura acontece a redução do nível de água da Laguna e com auxílio dos ventos ocorre a entrada de água salgada do Oceano Atlântico, ocasionando a salinidade do solo de cultivo de arroz (CARMONA et al., 2011, DENARDIN et al., 2018). O solo é considerado salino quando a condutividade elétrica é de  $4\text{dS m}^{-1}$  (NaCl 40 mM) sendo que o arroz já apresenta sensibilidade em condutividade elétrica de  $3\text{dS m}^{-1}$ . O arroz é sensível à salinidade nos estádios de plântula e reprodutivo e apresenta maior tolerância na germinação e no estágio vegetativo (revisado por NEGRÃO et al., 2011). A salinidade ocasiona estresse osmótico, o que reduz a captação de água. Além disso, pode ocasionar estresse iônico devido ao acúmulo de sais em níveis tóxicos nos tecidos (revisado por CASTILLO et al., 2007). Danos como senescência prematura, redução da parte aérea e dos afilhos férteis, clorose, e esterilidade das espiguetas são alguns dos efeitos ocasionados pela salinidade (CARMONA et al., 2011). As plantas apresentam diferentes mecanismos para lidar com a salinidade e que podem levar a tolerância, os quais incluem restrição da entrada de sais, compartimentalização e síntese de osmoprotetores como prolina (PER et al., 2017; (REDDY et al., 2017).

Devido ao sistema de cultivo predominante no RS ser irrigação por inundação, o estado não enfrenta problemas com seca. No entanto, esse estresse deve ser considerado, já que causa danos no arroz quando cultivado no sistema de sequeiro, em pequenas áreas no Brasil e em diversas regiões do mundo, principalmente América Latina e África. Além disso, deve-se considerar o problema de escassez de água (LANNA et al., 2021). A tolerância a seca é uma característica complexa, que depende da ação e interação de diferentes respostas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. A resistência a seca é definida como a capacidade da planta produzir o seu máximo mesmo em condição limitada de água. A tolerância a seca é a capacidade da planta sobreviver sob condição de baixo teor de água nos tecidos. O escape da seca é capacidade da planta finalizar o ciclo antes da drástica redução de água no solo. A prevenção de seca é capacidade da planta de manter alto potencial de água

nos tecidos mesmo na falta de água no solo (PANDA et al., 2021). Nos estádios iniciais de desenvolvimento do arroz o principal impacto da seca é a redução da germinação e do crescimento. Em condição de seca ocorre redução no crescimento das folhas e alterações na sua estrutura, alongamento das raízes, redução da fotossíntese, acúmulo de osmoprotetores como prolina e produção de espécies reativas de oxigênio (PANDA et al., 2021). O arroz também é muito sensível a seca no estágio de florescimento, levando a significativa redução de produtividade (YANG et al., 2019).

A temperatura ótima para o desenvolvimento do arroz é de 15°C a 25°C (YOSHIDA, 1981). A semeadura de arroz no RS ocorre preferencialmente nos meses de outubro e novembro, em que a temperatura média é 15°C (CRUZ et al., 2006), e no estado são utilizadas majoritariamente cultivares da subespécie *indica* (sensíveis ao frio). Por isso, há um impacto das baixas temperaturas na fase inicial de estabelecimento e desenvolvimento da planta (MARTINI et al., 2014). O frio afeta a germinação no momento do alongamento do coleóptilo (estádio S3), e também quando a plântula atinge os estádios V1 a V4 (COUNCE et al., 2000; SHAKIBA et al., 2017). No RS também é comum a ocorrência de baixas temperaturas noturnas no mês de fevereiro, período em que o arroz se encontra no estágio reprodutivo. Nesse estágio, mais especificamente em R3, quando ocorre a saída da panícula da folha bandeira, o arroz é sensível ao frio, ocorrendo esterilidade das espiguetas devido ao impacto na produção de pólen (COUNCE et al., 2000; SHINADA et al. 2013). As plantas respondem ao frio através de diferentes mecanismos, como por exemplo, mudanças na conformação lipídica da membrana plasmática e acúmulo de solutos como carboidratos (RUELLAND et al., 2009).

A produção de arroz nessas condições está se tornando cada vez mais vulnerável, e por vezes pode ser insustentável. Dessa forma, tolerância a múltiplos estresses abióticos precisa ser considerada em programas de melhoramento. Embora alguns avanços tenham sido obtidos, o processo de melhoramento convencional para tolerância a estresses abióticos é um processo longo e limitado, devido à complexidade da tolerância a estresses abióticos (WANG et al., 2016). A transgenia e edição de genomas são abordagens potenciais para auxiliar o melhoramento convencional. Nos últimos anos a transgenia, e mais recentemente a tecnologia CRISPR/Cas9 (edição),

permitiram avanços notáveis na manipulação de genes visando a tolerância a estresses abióticos. A exatidão e precisão dessas técnicas podem garantir o grande sucesso do melhoramento de plantas no futuro (ANWAR; KIM 2020). No entanto, antes da manipulação genética, é necessário a identificação e caracterização de genes candidatos, miRNAs e fatores de transcrição envolvidos na resposta e tolerância aos estresses abióticos.

Anwar e Kim (2020) relatam o grande número de genes, fatores de transcrição e miRNA envolvidos na tolerância a diferentes estresses abióticos em plantas. Dentre os genes pode-se citar os codificadores de enzimas do sistema antioxidante, MAPK, dentre outros. Os fatores de transcrição que atuam na sinalização em resposta a estresses abióticos incluem WRKY, NAC, MYB, DREB, bHLH, bZIP. Além disso, inúmeros miRNAs também foram associados com resposta a estresses abióticos.

Em condições adversas ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que podem danificar membranas e biomoléculas. A autofagia é o processo responsável pelo transporte de componentes celulares danificados para o vacúolo para degradação e reciclagem e tem sido associado com a tolerância a estresses bióticos e abióticos (SIGNORELLI et al., 2019). Nas plantas ocorre três tipos de autofagia, microautofagia (componentes citoplasmáticos na superfície do vacúolo), macroautofagia (materiais a serem degradados ficam em vesículas citoplasmáticas, provenientes de um fagóforo que gera autofagossomo) e mega-autofagia (degradação de todo conteúdo citoplasmático). Para que o processo de macroautofagia (denominada de autofagia a partir daqui) ocorra, mais de 30 genes *ATG* (*autophagy related genes*) estão envolvidos (MARSHALL; VIERSTRA, 2018).

A participação de genes *ATGs* na resposta a diferentes estresses abióticos tem sido reportada em diferentes espécies, inclusive em arroz. Shin et al., (2009) demonstraram que o gene *OsATG10b* tem um papel importante na sobrevivência de células de arroz contra estresse oxidativo. O envolvimento do gene *OsATG6* na resposta a calor, frio, seca em arroz foi demonstrado por Ranna et al., (2012). O gene *TdAtg8* desempenha um papel na resposta à seca e ao estresse osmótico em trigo selvagem (KUZUOGLU-OZTURK et al., 2012). Em tomate, a superexpressão do gene que codifica o fator de transcrição

*HSFA1a* tem um papel importante na tolerância a seca devido a indução de genes *ATG* (WANG et al., 2015). Em estudo desenvolvido por Sun et al., (2018) foi demonstrado que a superexpressão de *MdATG18a* melhorou a tolerância a seca. Vários outros estudos que relacionam os genes *ATG* com a resposta e tolerância a estresses abióticos em plantas são relatados por Chen et al., (2021).

Dentro do contexto abordado, esse estudo teve como objetivo analisar o perfil transcricional dos genes *OsATG* em plântulas de arroz submetidas aos estresses por submergência, salinidade, seca e frio. Os resultados obtidos podem auxiliar na seleção de genes candidatos para manipulação genética visando tolerância a estresses abióticos em arroz.

## 2 Material e Métodos

Genes *OsATG* em arroz foram identificados no banco de dados RAP-DB (The Rice Annotation Project - <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) (Tabela 1).

O perfil transcricional dos genes *OsATG* em plântulas de arroz sob condição de submergência, salinidade, frio e seca foi obtido no banco de dados TENOR (*Transcriptome ENcyclopedia Of Rice* – <https://tenor.dna.affrc.go.jp/downloads>) (KAWAHARA et al., 2016). Neste banco estão disponíveis dados de RNASeq de plântulas de arroz sob diferentes condições ambientais adversas. Em todas as condições foram utilizadas plântulas de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare. As plântulas foram crescidas em hidroponia utilizando solução de Yoshida, a 28°C e 16h-luz/8h-escuro.

Para avaliar o perfil de expressão gênica em condição de submergência, plântulas com 10 dias foram submersas em solução hidropônica de Yoshida e analisadas após 0h (controle), 1h, 3h, 6h, 12h, 1d e 3d. Na condição de salinidade, plântulas com 7 dias foram transferidas para recipiente com água destilada acrescida de NaCl a uma concentração de 150mM e analisadas após 0h (controle) e 1h. Para a condição de seca as plântulas com 10 dias foram removidas da solução hidropônica de Yoshida (Yoshida, 1981) e analisadas após 0h (controle), 1h, 3h, 6h, 12h e 1d. Por fim, para a condição de frio, plântulas com 10 dias foram mantidas em solução hidropônica de Yoshida (Yoshida, 1981)

e transferidas para temperatura de 4°C e avaliadas após 0h (controle), 1h, 3h, 6h, 12h e 1d.

O acúmulo de transcritos foi apresentado em *fold change*, ou seja, número de vezes que a expressão aumentou ou reduziu nas condições adversas em relação ao controle. Os dados foram apresentados em *heat map* usando o programa Multi Experiment Viewer (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003).

### **3 Resultados e Discussão**

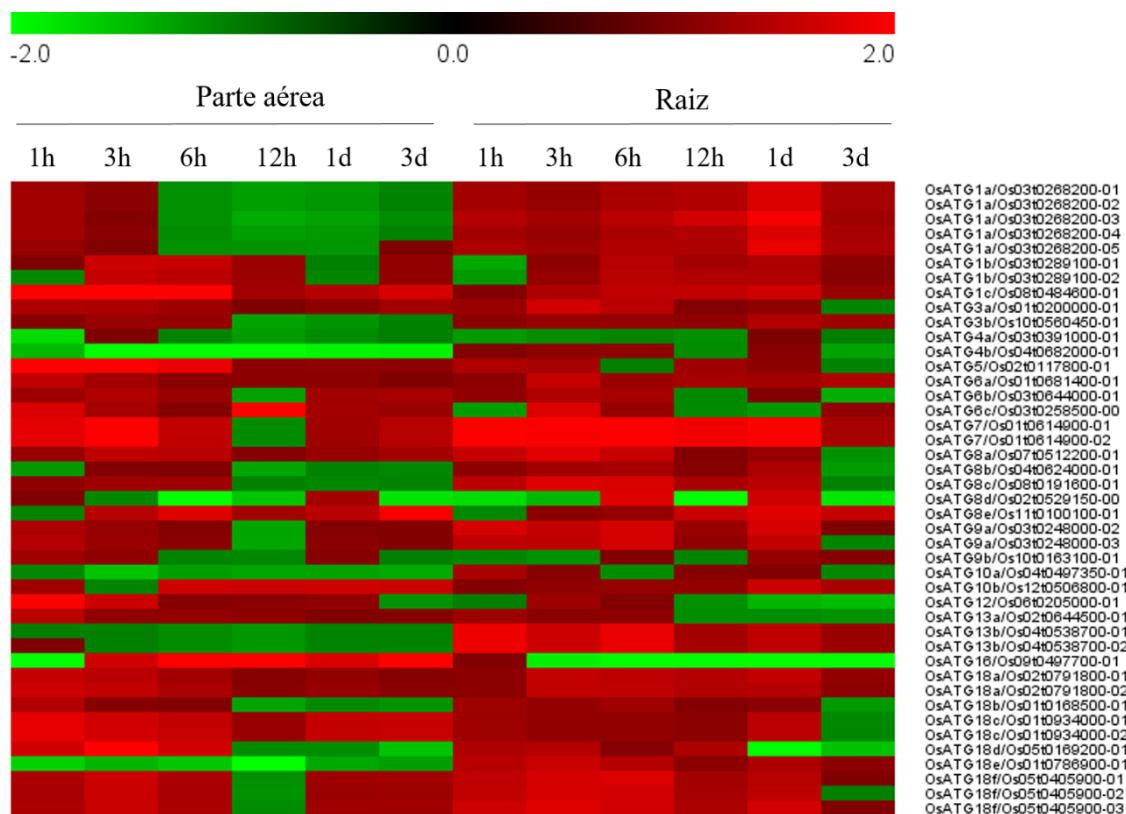
Foram encontrados 31 genes *OsATG* no banco de dados RAP-DB, dois quais 8 apresentam transcritos alternativos (Tabela 1). Em estudo prévio, Xia et al., (2011) encontraram 33 genes *OsATG* em arroz, e desses 6 apresentavam *splicing* alternativo. A partir de diferentes análises os autores já haviam detectado ausência da sequência completa de cDNA de um dos genes e ausência de mapeamento de outro gene no banco de dados RAP-DB.

**Tabela 1.** Genes *OsATG* presentes em arroz.

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

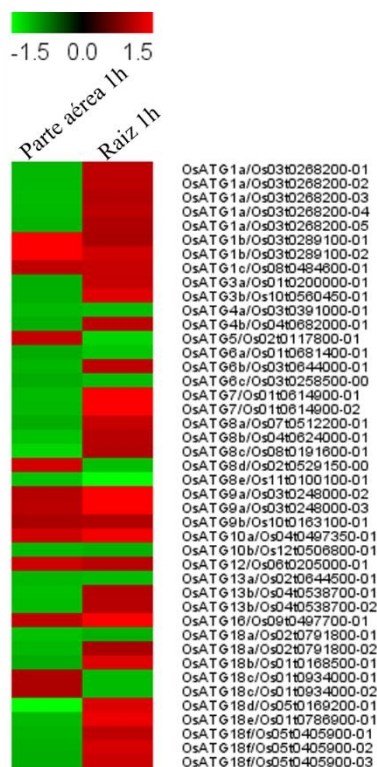
A grande maioria dos genes *OsATGs* foi induzida na condição de submergência (Figura 1). Alguns genes tiveram expressão variável, sendo induzidos na parte aérea e reprimidos na raiz, enquanto outros foram reprimidos na parte aérea e induzidos na raiz. Genes com perfil transcricional similar entre parte aérea e raiz também foi observado. Em estudo desenvolvido com *Arabidopsis* sob alagamento também foi verificado um aumento nos níveis de transcritos de genes *ATG* em raízes, e o autores relacionam esse aumento com a atenuação da morte celular programada (GUAN et al., 2019). Chen et al., (2015) já haviam demonstrado que a autofagia contribuiu com resposta a hipóxia durante a submergência em *Arabidopsis*. Esses resultados demonstram que genes *OsATG* podem ser candidatos para tolerância a submergência em arroz.





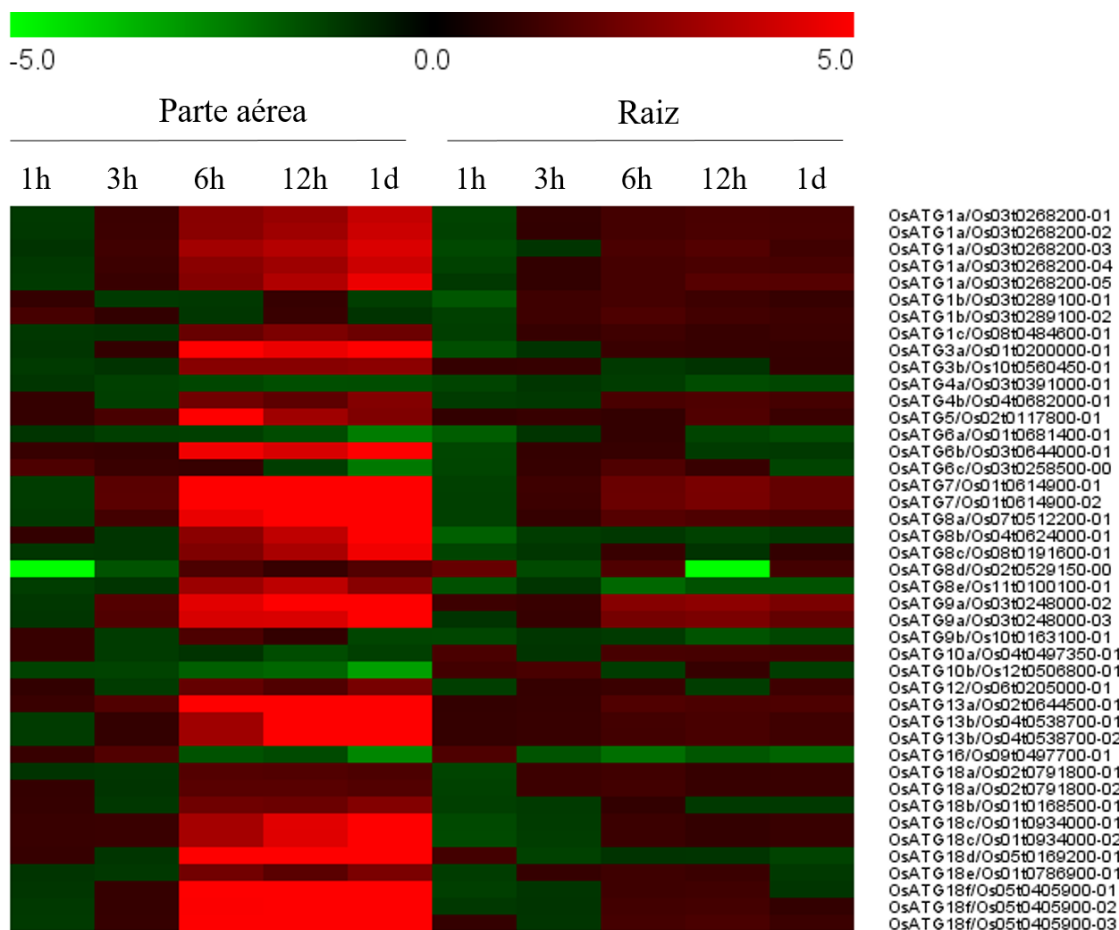
**Figura 1.** Perfil transcricional de genes *OsATG* em parte aérea e raiz de plântulas de arroz submetidas a submersão. Verde representa redução no acúmulo de transcritos quando se compara a condição adversa com o controle, vermelho representa aumento no acúmulo de transcritos quando se compara a condição adversa com o controle.

Sob condição de salinidade a maior parte dos genes *OsATG* foi reprimida na parte aérea e induzida na raiz (Figura 2). Isso pode ser explicado pelo fato que o primeiro tecido que fica em contato com o estresse é a raiz, e o período de estresse é relativamente curto para desencadear respostas na parte aérea. O aumento da transcrição nas raízes indica o envolvimento desses genes na resposta ao estresse por salinidade em arroz. Luo et al., (2017) demonstraram que a autofagia é rapidamente induzida nas raízes pelo estresse por sal e está associada a tolerância a salinidade em *Arabidopsis*. A superexpressão de *MdATG10* aumenta a autofagia nas raízes e aumenta a tolerância a salinidade em maçã (HUO et al., 2020). Lui et al. (2009) já haviam sugerido que a autofagia é requerida para tolerância a salinidade em plantas. Portanto, no arroz, genes *OsATG* também podem ser considerados para melhorar tolerância a salinidade.



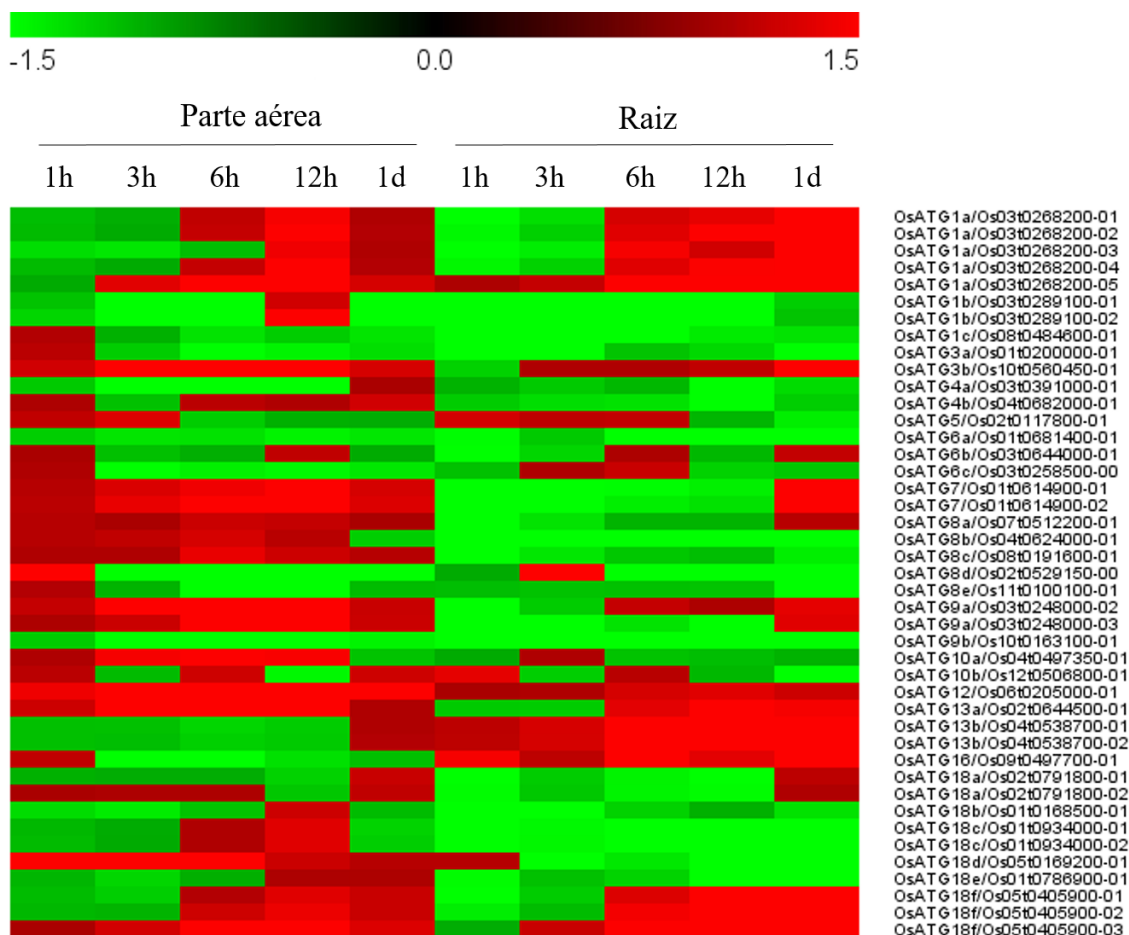
**Figura 2.** Perfil transcricional de genes *OsATG* em parte aérea e raiz de plântulas de arroz submetidas a salinidade. Verde representa redução no acúmulo de transcritos quando se compara a condição adversa com o controle, vermelho representa aumento no acúmulo de transcritos quando se compara a condição adversa com o controle.

De maneira geral, genes *OsATG* apresentaram maior acúmulo de transcritos na parte aérea do que na raiz de plântulas submetidas a seca, e esse acúmulo ocorre 6h após o início do estresse (Figura 3). Esse perfil transcricional indica a participação desse mecanismo na resposta ao estresse por seca em arroz. O envolvimento de genes *ATG* na resposta seca já havia sido reportado por Liu et al., (2009). Li et al., (2015) demonstraram que a superexpressão de *SiATG8a* de capim em *Arabidopsis* conferia tolerância à seca. Além disso, estudos desenvolvidos com maçã também evidenciaram que *MdATG18a* aumenta tolerância a seca (SUN et al., 2018). Portanto, genes *OsATG* devem ser estudados mais profundamente em arroz para utilização no melhoramento para tolerância à seca.



**Figura 3.** Perfil transcricional de genes *OsATG* em parte aérea e raiz de plântulas de arroz submetidas a seca. Verde representa redução no acúmulo de transcritos quando se compara a condição adversa com o controle, vermelho representa aumento no acúmulo de transcritos quando se compara a condição adversa com o controle.

Quando as plântulas foram submetidas ao frio, os genes *OsATG* apresentaram perfil transcricional bastante variável entre tecidos e períodos de estresse (Figura 4). *OsATG1a*, *OsATG3b*, *OsATG12* e *OsATG18f* foram induzidos em ambos tecidos. *OsATG7*, *OsATG8a*, *OsATG8b*, *OsATG8c*, *OsATG18a*, *OsATG18b*, *OsATG18c*, *OsATG18d* e *OsATG18e* foram induzidos na raiz, enquanto que *OsATG13b* e *OsATG16* foram induzidos na parte aérea, indicando seu envolvimento na resposta do arroz em frio. A participação de genes *ATGs* na resposta ao frio demonstrada por Fu et al., (2020), que ao conduzir a expressão de *CsATG18b* de laranja em *Arabidopsis* verificou tolerância ao frio.



**Figura 4.** Perfil transcricional de genes *OsATG* em parte aérea e raiz de plântulas de arroz submetidas ao frio. Verde representa redução no acúmulo de transcritos quando se compara a condição adversa com o controle, vermelho representa aumento no acúmulo de transcritos quando se compara a condição adversa com o controle.

#### 4 Considerações finais

O acúmulo de transcritos dos genes *OsATG* foi induzido na raiz e na parte aérea de plântulas de arroz submetidas aos estresses por submergência, salinidade, seca e frio, demonstrando a participação desses genes na resposta aos estresses. Dessa forma, esses genes são candidatos potenciais para manipulação genética visando aumento da tolerância a estresses abióticos em arroz. No entanto, mais estudos devem ser conduzidos para seleção de genes *OsATG* de grandes efeitos no mecanismo de tolerância.

## Referências

ANWAR A., JU-KON K. "Transgenic Breeding Approaches for Improving Abiotic Stress Tolerance: Recent Progress and Future Perspectives." **International Journal of Molecular Sciences**. v. 21, n.8. p.2695, 2020.

CARMONA F.C., ANGHINONI I., WEBER E.J. Salinidade da água e do solo e seus efeitos sobre o arroz irrigado no Rio Grande do Sul. Instituto Rio Grandense do Arroz, Boletim técnico nº 10, 2011.

CASTILLO E.G., TUONG T.P., ISMAIL A.M., INUBUSHI K. Response to Salinity in Rice: Comparative Effects of Osmotic and Ionic Stresses. **Plant Production Science**, v. 10, n. 2, p.159-170, 2007.

CHEN H., DONG J., WANG T. Autophagy in Plant Abiotic Stress Management. **International Journal of Molecular Sciences**. n. 22, p. 4075, 2021.

CHEN L., LIAO B., QI H., XIE L.J., HUANG L., TAN W.J., ZHAI N., YUAN L.B., ZHOU Y., YU L.J., CHEN Q.F., SHU W., XIAO S. Autophagy contributes to regulation of the hypoxia response during submergence in *Arabidopsis thaliana*. **Autophagy**, v. 11, n. 12, p. 2233-2246, 2015.

COUNCE P.A., KEISLING T.C., MITCHELL A.J. A uniform, objectives, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, n. 40, p. 436-443, 2000.

CRUZ R.P., MILACH S.C.K., FEDERIZZI L.C. Rice cold tolerance at the reproductive stage in a controlled environment. **Scientia Agricola**, v. 63, n.3, p. 255-261, 2006.

DENARDIN L.G.O., CARMONA F.C., TIECHER T., MARTINS A.P., ALVES L.A., WEBER E.J., ANGHINONI I. Salt-affected soils of the coastal plains in Rio Grande do Sul, Brazil. **Geoderma Regional**. 14, e00186, 2018.

FU X.Z., ZHOU X., XU Y.Y., HUI Q.L., CHUN C.P., LING L.L., PENG L.Z. Comprehensive Analysis of Autophagy-Related Genes in Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Highlights Their Roles in Response to Abiotic Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 21, n. 8, p. 2699, 2020.

GUAN B., LIN Z., LIU D., et al. Effect of Waterlogging-Induced Autophagy on Programmed Cell Death in *Arabidopsis* Roots. **Frontiers in Plant Science**. 10:468, 2019.

HE M., HE C.Q., DING N.Z. Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**. 9, 2018.

HUO L., GUO Z., JIA X., SUN X., WANG P., GONG X., MA F. Increased autophagic activity in roots caused by overexpression of the autophagy-related gene MdATG10 in apple enhances salt tolerance. **Plant Science**, 294, 2020.

KAWAHARA Y., OONO Y., WAKIMOTO H., OGATA J., KANAMORI H., SASAKI H., MORI S., MATSUMOTO T., ITOH T. TENOR: Database for Comprehensive mRNA-Seq Experiments in Rice. **Plant Cell Physiology**, 57(1): e7, 2016.

KUZUOGLU-OZTURK D., CEBECI YALCINKAYA O., AKPINAR, B.A. et al. Autophagy-related gene, TdAtg8, in wild emmer wheat plays a role in drought and osmotic stress response. **Planta** n. 236, p.1081–1092, 2012.

LANNA A.C. et al. Upland rice: phenotypic diversity for drought tolerance. **Scientia Agricola** [online]. 78, 5, e20190338, 2021.

LI WW, CHEN M, ZHONG L, LIU JM, XU ZS, LI LC, ZHOU YB, GUO CH, MA YZ. Overexpression of the autophagy-related gene SiATG8a from foxtail millet (*Setaria italica* L.) confers tolerance to both nitrogen starvation and drought stress in *Arabidopsis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468 n. 4 p. 800-6, 2015.

LIU Y., XIONG Y., BASSHAM D.C. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. **Autophagy**, v. 5, n. 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**, 8, 2017.

MARSHALL R. S., VIERSTRA R.D. Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 69, n. 22, p. 1–22.36, 2018.

MARTINI L.F.D., BURGIS N.R., NOLDIN J.A., AVILA L.A., SALAS R.A. Absorption, translocation and metabolism of bispyribac-sodium on rice seedlings under cold stress. **Pest Management Science**, v. 71, n. 7, p. 1021-1029, 2014.

MELO F.V., OLIVEIRA M.M., SAIBO N.J.M., LOURENÇO T.F. Modulation of Abiotic Stress Responses in Rice by E3-Ubiquitin Ligases: A Promising Way to Develop Stress-Tolerant Crops. **Frontiers in Plant Science**, 2021.

NEGRÃO S., COURTOIS B., AHMADI N., ABREU I., SAIBO N., OLIVEIRA M.M. Recent Updates on Salinity Stress in Rice: From Physiological to Molecular Responses. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 4, p. 329-377, 2011.

NISHIUCHI S., YAMAUCHI T., TAKAHASHI H. et al. Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice. **Rice** n. 5, p. 2, 2012.

PANDA D., BARIK J. Flooding Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches, **Rice Science**, v. 28, n. 1, p. 43-57, 2021.

PANDA D., MISHRA S.S., BEHERA P.K. Drought Tolerance in Rice: Focus on Recent Mechanisms and Approaches, **Rice Science**, n. 28, p. 2, 2021.

PER, T.S., KHAN N.A., REDDY P.S., MASOOD A., HASANUZZAMAN M., KHAN M.I.R., ANJUM N.A. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, n.115, p.126-140, 2017.

RANA R.M., DONG S., ALI Z., HUANG J., ZHANG H.S. Regulation of ATG6/Beclin-1 homologs by abiotic stresses and hormones in rice (*Oryza sativa* L.). **Genetics and Molecular Research**. v. 11, n. 4, p. 3676-87, 2012.

REDDY I.N.L., KIM B.K., YOON I., S., KIM K.H., KWON T.R. Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches. **Rice Science**, v. 24, n. 3, p. 123-144, 2017.

RUELLAND E., VAUTIER M., ZACHOWSKI A., HURRY V. Cold signaling and cold acclimation in plants. In: **Advances in Botanical Research**, p. 35-150, 2009.

SAEED A.I. et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **BioTechniques**, n. 34, p. 374-378, 2003.

SHAKIBA, E.; EDWARDS, J. D.; JODARI, F.; DUKE, S. E.; BALDO, A. M.; KORNILIEV, P.; MACCOUCH, S. R.; EIZENGA, G. C. Genetic architecture of cold tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through high resolution genome-wide analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0172133, 2017.

SHIN J.H., YOSHIMOTO K., OHSUMI Y., JEON J.S., AN G. OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. **Molecules and Cells**, v. 27, n. 1, p. 67-74, 2009

SHINADA, H.; IWATA, N.; SATO, T.; FUJINO, K. Genetical and morphological characterization of cold tolerance at fertilization stage in rice. **Breeding Science**, n. 63, p.197-204, 2013.

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, n. 5, p.413-430, 2019.

SUN X., WANG P., JIA X., HUO L., CHE R., MA F. Improvement of drought tolerance by overexpressing MdATG18a is mediated by modified antioxidant system and activated autophagy in transgenic apple. **Plant Biotechnology Journal**, 2018

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** n. 18, p. 363–377, 2011.

YANG X., WANG B., CHEN L. et al. The different influences of drought stress at the flowering stage on rice physiological traits, grain yield, and quality. **Scientific Reports** n. 9, p. 3742, 2019.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1981. cap.1, p.1-63.

WANG Y., CAI S., YIN L., et al. Tomato HsfA1a plays a critical role in plant drought tolerance by activating ATG genes and inducing autophagy. **Autophagy**. v.11, n.11, p. 2033-2047, 2015.

WANG H., WANG H., SHAO H., TANG X. Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. **Frontiers in Plant Science**. 7, 2016.