

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Padrão de expressão de aquaporinas em plantas de arroz
tolerantes e sensíveis ao arsênio

Dissertação de Mestrado

Thyalla Copetti Buzinello

Porto Alegre, abril de 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Padrão de expressão de aquaporinas em plantas de arroz
tolerantes e sensíveis ao arsênio

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Thyalla Copetti Buzinello

Orientadora: Dra. Fernanda Stanisçuaski

Co-orientadora: Dra. Janette Palma Fett

Porto Alegre, abril de 2018

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteínas Tóxicas, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS), sob orientação da Dra. Fernanda Stanisçuaski e co-orientação da Dra. Janette Palma Fett. Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca Examinadora

Dr. Raul A. Sperotto
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
UNIVATES

Dr. Felipe K. Ricachenevsky
PPGBCM – UFRGS

Dra. Márcia P. Margis
PPGBCM – UFRGS

Dra. Fernanda Lopes
PPGBCM – UFRGS
Revisora e membro suplente

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais presentes em minha vida:

Minha mãe, pelo exemplo de vida que é.

Meu pai, o mais generoso de todos os pais.

Meu irmão e minha sobrinha e afilhada, pelo incentivo direto ou indireto.

Cícero e Alzira, por estarem ao meu lado nos melhores e piores momentos de minha vida.

AMO MUITO VOCÊS!

A meus pais, **Jusce** e **Tere**, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao **Cícero**, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito parte deste sonho!

Ao meu irmão, *Vagner*, e a minha sobrinha *Sthefany* meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho. Obrigada pela confiança!

Agradeço também a meus sogros, *Chico* e *Neusa*, pelo incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho!

Aos meus amigos de sempre, *Alini*, *Fábio* e *Thuey*, por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa. Obrigada pela amizade!

À Prof^a *Fernanda*, é claro, que acreditou em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponível e disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento. Fez-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, mas vidas humanas... Você não foi somente orientadora, mas, em alguns momentos, conselheira, confidente e amiga.

Você foi e é referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar tanto em mim!

À Profª *Janette*, minha co-orientadora, que me deu todo o suporte com suas correções e incentivos. Obrigada de verdade!

A meus amigos do mestrado e colegas do Lab, em especial a *Júlia, Jennifer, Andriele, Anne, Fernanda* obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Obrigada pela paciência e por terem me ajudado tanto. Foi bom poder contar com vocês!

Finalmente, gostaria de agradecer à UFGRS por abrir as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Proporcionar-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

“Não importa o que aconteça, continue a nadar.”
(WALTERS, GRAHAM; **PROCURANDO NEMO**, 2003).

Sumário

Lista de abreviaturas	viii
Lista de figuras e tabelas	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	13
1.1. Arsênio.....	13
1.2. Arsênio em cultivo de arroz.....	14
1.3. Transportadores de arsênio em plantas	17
1.4. Aquaporinas.....	20
2. Objetivos	23
2.1. Objetivos Gerais.....	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Material vegetal e condições de crescimento	24
3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	26
3.3. Análise de perfil de expressão	26
3.4. Teste de complementação funcional em leveduras	28
4. Resultados e discussão	29
4.1. Testes de tolerância ou sensibilidade das cultivares ao As ^{III}	29
4.2. Análise de expressão dos genes em resposta ao tratamento com As ^{III}	30
4.3. Ensaio de complementação funcional	36
5. Conclusões finais	38
6. Perspectivas.....	39
7. Referências bibliográficas.....	40
8. Apêndice	43

Lista de abreviaturas

As: Arsênio

As^{III}: Arsenito

As^V: Arsenato

cDNA: DNA complementar

Asi: Arsênio inorgânico

IRGA: Instituto Riograndense do Arroz

HAC1: Alto teor de arsênio 1 (do inglês *High Arsenic Content 1*)

mRNA: RNA mensageiro

NIPs: Proteínas intrínsecas tipo Nodulina 26 (do inglês *Nodulin-26 like intrinsic proteins*)

Aso: Arsênio orgânico

PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PIPs: Proteínas intrínsecas da membrana plasmática (do inglês *Plasma membrane intrinsic proteins*)

qPCR: PCR quantitativo

RNA: ácido ribonucleico

SIPs: Proteínas intrínsecas pequenas (do inglês *Small intrinsic proteins*)

TIPs: Proteínas intrínsecas de tonoplasto (do inglês *Tonoplast intrinsic proteins*)

UBQ5: Ubiquitina 5

XIPs: Proteínas intrínsecas não caracterizadas (do inglês *Uncharacterized intrinsic proteins*)

Lista de figuras e tabelas

Figura 1. Representação em diagramas das espécies de arsênio detectadas em plantas terrestres.

Figura 2. Diagrama esquemático da absorção e metabolismo do arsênio em raízes de não hiperacumuladoras e de hiperacumuladoras.

Figura 3. Diagrama esquemático mostrando a via de absorção de As, genes de arroz e genes de outras espécies que podem ser manipulados para diminuir o transporte e acumulação de As nos grãos de arroz.

Figura 4. Estrutura tridimensional de uma aquaporina.

Figura 5. Diagrama esquemático simplificado do transporte e do metabolismo do As nas plantas.

Figura 6. Plântulas crescendo em vermiculita embebida com solução nutritiva

Figura 7. Plântulas em copos de plástico contendo solução nutritiva, pH 5,4

Figura 8. Plântulas IRGA 424 e BR-IRGA 409 após 7 dias de germinação e peso das plântulas germinadas com 10 μM As^{III} e sem As^{III}

Figura 9. Nível de expressão de genes de aquaporinas depois de crescimento hidropônico com 100 μM As^{III} por 24 h

Figura 10. Nível de expressão de genes de aquaporinas depois de crescimento em meio com 10 μM As^{III} por 24 horas

Figura 11. Nível de expressão de genes de aquaporinas depois de crescimento em meio com 10 μM As^{III} por 7 dias

Figura 12. Diagrama esquemático das aquaporinas diferencialmente expressas entre os cultivares sensível e tolerante ao As e em diferentes tecidos

Figura 13. Expressão do gene *OsPIP2;3* (Os04g44060) em diferentes tecidos de arroz

Tabela 1. Sequência de primers de genes de aquaporinas, *Lsi2* e *UBQ5* usados para RT-PCR e real-time PCR

Figura S1. Expressão do gene *OsPIP1;3* (Os02g57720) em diferentes tecidos de arroz

Figura S2. Expressão do gene *OsPIP2;2* (Os02g41860) em diferentes tecidos de arroz

Figura S3. Expressão do gene *OsTIP1;1* (Os03g05290) em diferentes tecidos de arroz

Figura S4. Expressão do gene *OsSIP2;1* (Os03g20410) em diferentes tecidos de arroz

Figura S5. Expressão do gene *OsNIP3;2* (Os08g05590) em diferentes tecidos de arroz

Resumo

As aquaporinas são proteínas de membrana presentes em quase todos os órgãos e tecidos de animais e plantas, onde desempenham funções que vão além do transporte de água, transportando também moléculas como ureia, ácido bórico, ácido silícico, amônia, dióxido de carbono e arsênio. Em plantas, as aquaporinas podem ser classificadas de acordo com suas sequências de aminoácidos em cinco subfamílias: proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas de tonoplastos (TIPs), proteínas intrínsecas do tipo nodulina 26 (NIPs), proteínas intrínsecas pequenas (SIPs) e proteínas intrínsecas não caracterizadas (XIPs). Dados genômicos determinam o número de genes de aquaporinas em 33 para arroz, 35 para *Arabidopsis*, 71 para algodão e 66 para soja. Dentre as principais culturas utilizadas como alimento, o arroz é particularmente eficiente no acúmulo do semimetal altamente tóxico e carcinogênico arsênio (As), representando um risco significativo para a saúde humana. Assim, o principal objetivo deste trabalho é elucidar o papel das aquaporinas no transporte de As em arroz. Utilizando cultivares que apresentam susceptibilidade diferencial ao arsênio, foi analisada a expressão dos genes de aquaporinas em resposta ao tratamento com arsenito em diferentes condições. Para a caracterização dos genes de aquaporinas diferencialmente expressos, foram realizados ensaios de complementação funcional em leveduras. Nossos resultados indicam que membros das subfamílias NIP, TIP, PIP e SIP podem estar envolvidos no transporte e metabolismo de As em arroz, dentre estes, quatro podem estar envolvidos no transporte de As para dentro da célula e seis membros podem estar envolvidos no transporte de As para os vacúolos, fazendo com que essas proteínas sejam candidatas a estratégias de melhoramento genético e fitorremediação.

Palavras-chave: arroz, aquaporinas, arsênio e arsenito.

Abstract

Aquaporins are membrane proteins present in almost all organs and tissues of animals and plants, where they perform functions that go beyond water transport, also transporting molecules such as urea, boric acid, silicic acid, ammonia, carbon dioxide and arsenic. In plants, aquaporins can be classified according to their amino acid sequences into five subfamilies: plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), nodulin-26 like intrinsic proteins (NIPs), small intrinsic proteins (SIPs) and uncharacterized intrinsic proteins (XIPs). Genomic data set the number of aquaporin genes in 33 for rice, 35 for *Arabidopsis*, 71 for cotton and 66 for soybean. Among the main crops used as food, rice is particularly efficient in the accumulation of the highly toxic and carcinogenic metalloid arsenic, thus representing a significant risk to human health. Therefore, the main goal of this work is to elucidate the role of aquaporins in the transport of arsenic in rice. Using cultivars with differential susceptibility to arsenic, the expression of aquaporin genes in response to the arsenite treatment under different conditions was analyzed. For the characterization of differentially expressed aquaporin genes, functional complementation assays were performed in yeast cells. Our results indicate that members of the subfamilies NIP, TIP, PIP and SIP may be involved in the transport and metabolism of arsenic in rice, of these, four may be involved in the transport of As into the cell and six members may be involved in transporting As to the vacuoles, making these proteins candidates to genetic improvement strategies and phytoremediation.

Keywords: rice, aquaporins, arsenic, arsenite.

1. Introdução

1.1. Arsênio

O arsênio (As) é um semimetal bem conhecido por sua toxicidade para humanos e animais. A exposição excessiva ao As provoca numerosas doenças, tais como cânceres, diabetes, doenças cardiovasculares e distúrbios do desenvolvimento (CHEN et al., 2017a). O As é ubíquo no meio ambiente, sendo o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre, com uma concentração média de aproximadamente 3 mg.kg^{-1} (ZHAO et al., 2010). O As é um elemento que ocorre naturalmente, está presente em alimentos, solo, ar e água, e toda a população humana está exposta a ele de alguma forma (ABERNATHY et al., 1999). Estima-se que mais de 150 milhões de pessoas em todo o mundo tenham sido afetadas por concentrações elevadas de As no ambiente (BASTÍAS e BELDARRAIN, 2016). A presença de As em elevadas concentrações no meio ambiente deve-se às ações antropogênicas que incluem mineração, produção/uso de herbicidas e fungicidas, produção/uso de preservadores de madeira e corantes, fabricação de vidros, dentre outras. Adicionalmente, podem ocorrer acréscimos decorrentes de processos naturais oriundos de fontes geoquímicas e atividades vulcânicas (ALVES e SANTOS, 2006). A ingestão oral é a principal via de exposição humana (BASTÍAS e BELDARRAIN, 2016).

O arsênio orgânico (Aso) e inorgânico (Asi) existem no ambiente (Figura 1), mas o último é predominante (XU et al., 2015) e geralmente altamente tóxico para as plantas (ZHAO; MEHARG e MCGRATH, 2009). No entanto, micro-organismos podem metilar e desmetilar espécies de As nos solos, transformando espécies inorgânicas de As em espécies orgânicas e vice-versa (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer classificou as duas formas de Asi, arsenito (As^{III}) e arsenato (As^{V}) como agentes cancerígenos de tipo I, evidenciando a sua importância para a saúde pública. Observou-se que o As^{III} é 10 vezes mais tóxico do que o As^{V} (BASTÍAS e BELDARRAIN, 2016). Os micro-organismos, como as leveduras, reduzem o As^{V} em As^{III} através de uma enzima redutase de As^{V} , aumentando assim sua concentração no meio (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002). A toxicidade do

As^{III} é causada pela reação do As^{III} com grupos funcionais tiol e sulfidril em várias proteínas, o que leva à sua desativação ou disfunção (POMMERRENIG et al., 2015).

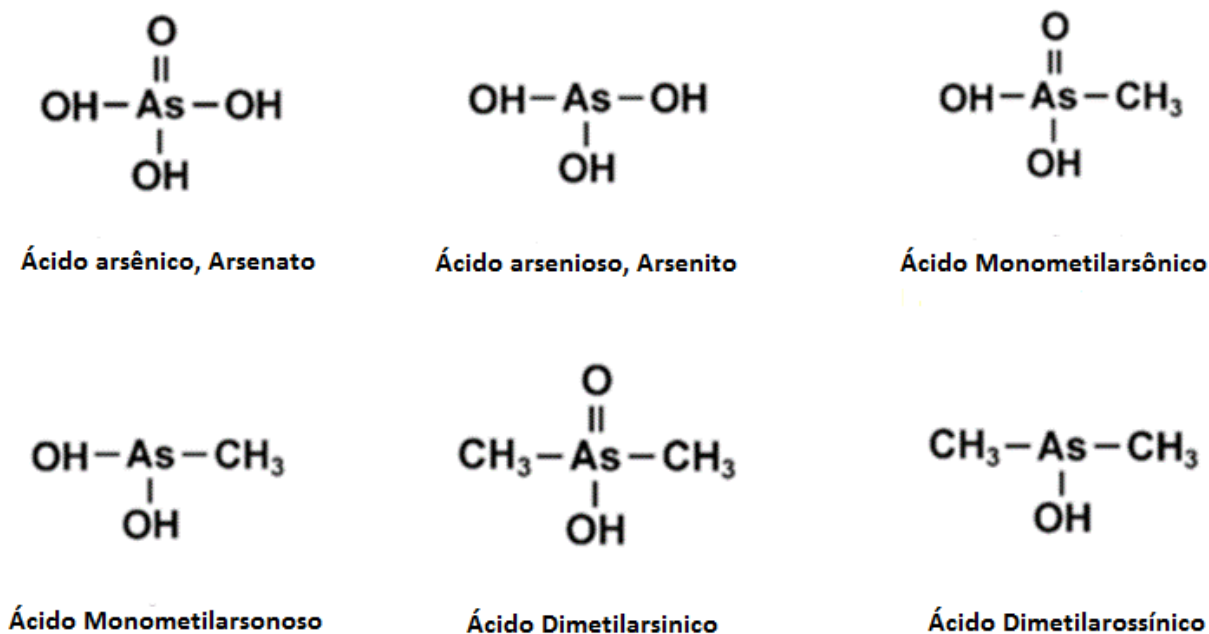


Figura 1. Representação em diagramas das espécies de arsênio detectadas em plantas terrestres. Figura adaptada de Hughes et al., 2011.

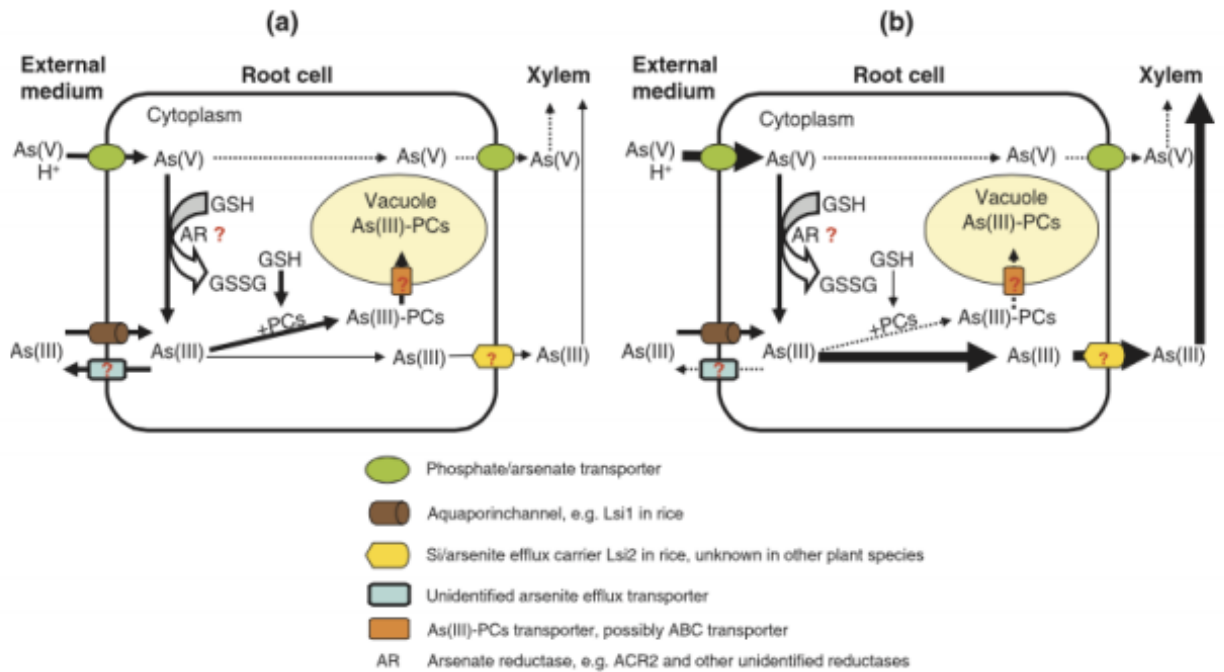
1.2. Arsênio em cultivo de arroz

A absorção excessiva de As pelas plantas pode se tornar um problema de segurança alimentar. Isso é exemplificado por descobertas que o arroz (*Oryza sativa*) é particularmente eficiente na absorção de As do solo, levando ao acúmulo em grãos de arroz em concentrações que podem representar um risco para a saúde das pessoas que consomem grandes quantidades deste cereal em sua dieta (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002). A contaminação das plantas por As é especialmente alta quando cultivadas em regiões agrícolas com altas concentrações de As biodisponíveis, onde o As^{III} é a espécie dominante (POMMERRENIG et al., 2015).

Estudos recentes mostraram que os alimentos, especialmente o arroz, são uma importante fonte de Asi para humanos (LI et al., 2009; WANG et al., 2015).

Numerosos estudos mostraram que a absorção, transporte e acúmulo de As em plantas de arroz diferem dependendo da cultivar de arroz e tipo de solo (CHEN et al., 2017b; LIU, 2003; NORTON et al., 2012). Alguns estudos realizados com diferentes genótipos de arroz demonstraram que há diferenças na concentração de As em partes da planta, com uma diminuição da raiz para o grão (BASTÍAS e BELDARRAIN, 2016). Grandes variações na concentração de As em grãos de diferentes variedades de arroz têm sido observadas em áreas consideradas de alta contaminação, como Bangladesh (ZAVALA e DUXBURY, 2008). Pesquisas com amostras comerciais também revelaram variabilidade semelhante. Parte dessa variabilidade pode ser explicada por diferenças nos níveis de irrigação com águas subterrâneas contaminadas com As (WILLIAMS et al., 2006).

As plantas variam em sua sensibilidade ou resistência ao As. A resistência geralmente é derivada através da supressão do sistema de absorção de fosfato/ As^V de alta afinidade (Figura 2). Pensa-se que esta supressão reduz o influxo de As^V até um nível no qual a planta pode desintoxicar, presumivelmente por mecanismos constitutivos. Apesar disso, as plantas tolerantes ao As^V podem acumular níveis consideráveis de As em seus tecidos (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002). Os hiperacumuladores de As têm um grau de tolerância muito mais alto do que as espécies não hiperacumuladoras (ZHAO, MEHARG e MCGRATH, 2009).



Espessura da linha refere-se a taxa de fluxo, a linha pontilhada indica o ritmo mais lento. Pontos de interrogação indicam grandes lacunas de conhecimento.

Figura 2. Diagrama esquemático da absorção e metabolismo do arsênio em raízes de plantas não hiperacumuladoras (a) e hiperacumuladoras (b). Figura adaptada de ZHAO; MEHARG e MCGRATH, 2009.

Em comparação com outras culturas de cereais, o arroz é cerca de 10 vezes mais eficiente no acúmulo de As (CHEN et al., 2017a). O arroz é caracterizado como um acumulador eficiente de As por causa da combinação de características biogeoquímicas de solos agrícolas e sua capacidade de absorver e transportar As (BASTÍAS e BELDARRAIN, 2016). A absorção de As pela planta de arroz depende de vários fatores. O cultivo em condições inundadas, a irrigação com água contaminada com As, bem como o solo naturalmente contaminado com este semimetal aumentam os níveis desse elemento em grãos de arroz (BATISTA et al., 2014). O acúmulo relativamente alto de As no arroz é preocupante, pois pode representar um risco significativo para a saúde (LI et al., 2009). A variação genética na resposta das plantas ao As, em termos de absorção e metabolismo, oferece potencial para desenvolver cultivares agrônomicas mais adequadas aos solos enriquecidos com As. Por exemplo, o desenvolvimento de cultivares que assimilem menos As ou diminuam a translocação de As para frutas/sementes, levaria a uma menor exposição

alimentar ao As (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002).

A capacidade das plantas em acumular e tolerar As também pode ser explorada para o desenvolvimento de tecnologias de fitorremediação visando a segurança alimentar (SOURI, KARIMI e SANDALIO, 2017). A fitorremediação tem sido proposta como uma metodologia alternativa na remoção de As de ambientes contaminados. Para isso, as espécies vegetais utilizadas devem ser eficientes na retirada de grande quantidade de As do solo ou da água (ALVES e SANTOS, 2006). Essa tecnologia usa plantas tolerantes a metais e hiperacumuladoras, que exibem altas taxas de crescimento, tolerância a grandes concentrações de metais pesados e capacidade de acumular altos níveis de metais pesados em suas partes acima do solo (SOURI, KARIMI e SANDALIO, 2017).

1.3. Transportadores de arsênio em plantas

Pouco se sabia sobre os mecanismos de absorção e transporte de As em plantas até recentemente. A pesquisa sobre os mecanismos de captação de As nas plantas se beneficiou muito do conhecimento adquirido com os estudos microbianos (ZHAO et al., 2010). No entanto, para compreender e gerir os riscos decorrentes da presença do As no solo é essencial conhecer como o As é absorvido pelas raízes e metabolizado dentro das plantas (Figura 3).

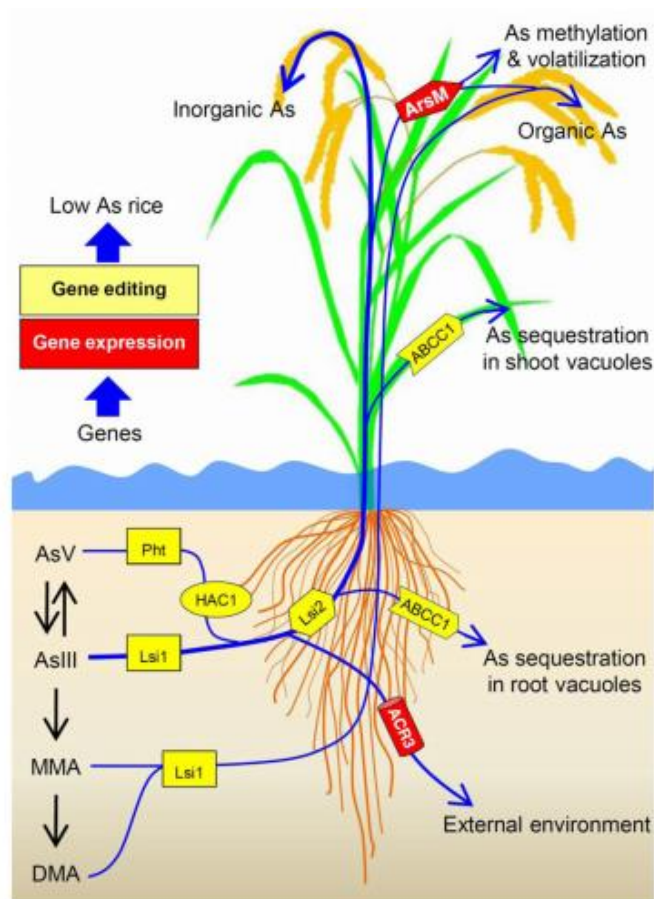


Figura 3. Diagrama esquemático mostrando a via de absorção de As, genes de arroz (*Pht*, *Lsi1*, *ACR2*, *HAC1*, *Lsi2* e *ABCC1*) e genes de outras espécies (*ArsM* e *ACR3*) que podem ser manipulados para diminuir o transporte e acúmulo de As nos grãos de arroz. Os transportadores Pht e Lsi1 contribuem para a absorção de As. A enzima Arsenato redutase (*HAC1*) é responsável pela redução do As^V em arroz. Lsi2 desempenha um papel crítico no transporte de As para o xilema da raiz e translocação de As, promovendo assim o transporte e o acúmulo de As em grãos de arroz. Em contraste, ABCC1 medeia o sequestro de As em vacúolos, especialmente em raízes e nós de arroz, restringindo o transporte de As aos grãos. A expressão heteróloga de ACR3 pode aumentar o efluxo de As^{III}, enquanto ArsM pode levar à metilação de As e posterior volatilização. Figura adaptada de Chen, 2017.

O transporte do As^{III} é muito mais prevalente do que se pensava anteriormente, pois é a principal espécie translocada de raízes para parte aérea, o que também é o gargalo não ficou claro o que é o gargalo da acumulação de As na parte aérea de plantas. O As^V é absorvido por transportadores de fosfato, incluindo AtPht1;1/4 em *Arabidopsis*, PvPht1;3 em *Pteris vittata* e OsPht1;8 (OsPT8) em arroz. Plantas *knockout* para o gene *OsPht1;8* diminuíram a absorção de As^V e aumentaram significativamente a tolerância ao As^V em arroz.

Após a absorção, o As^V pode ser rapidamente reduzido a As^{III} em células vegetais pela recém-identificada proteína HAC1 (High Arsenic Content 1) (CHEN et al., 2017b). Os genes da família *Pht1* (*OsPT1-OsPT13*) em arroz codificam os transportadores Pi que se localizam na membrana plasmática. O acúmulo de As na parte aérea do arroz é consistente com a expressão do gene *OsPT1*, indicando que *OsPT1* está envolvido na absorção de As^V do solo ao apoplasto (YE et al., 2017; ZHAO et al., 2010). Como os transportadores de As desempenham papéis essenciais nas plantas, não é concebível bloquear a entrada de As nas plantas, eliminando os transportadores responsáveis, sem afetar as funções da planta (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002).

Um transportador de tonoplasto (*OsABCC1*), localizado nas células companheiras do floema, foi identificado por diminuir a translocação de As em grãos de arroz, facilitando o sequestro de As em vacúolos (WANG et al., 2015). Depois de entrar nas células da raiz, o As^V é facilmente convertido em As^{III} e os canais de efluxo *Lsi1* podem expulsar As^{III} para fora da raiz ou para dentro do xilema (via *Lsi2*), levando ao transporte para a parte aérea e grãos (BATISTA et al., 2014). Devido à semelhança nas propriedades físico-químicas entre o ácido arsenoso e o ácido silícico, os transportadores de silício de arroz *Lsi1* e *Lsi2* também podem transportar As^{III} . *Lsi1* e *Lsi2* atuam como transportadores de influxo e efluxo, respectivamente, e estão localizados nos lados distal e proximal de exodermes e endodermes em raízes de arroz, formando um sistema de transporte unidirecional. O transportador *Lsi1* foi caracterizado como uma aquaporina (denominada *OsNIP2;1*), também sendo capaz de realizar o efluxo de As^{III} de células de raízes de arroz para o meio externo (XU et al., 2015). O As^{III} mostrou entrar em células vegetais através de aquaporinas (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002). As plantas possuem diversas isoformas de aquaporinas, e várias delas mostraram facilitar a absorção de semimetais, incluindo As e antimônio, bem como boro e silício (MEMBR, 2015). O silício não é considerado um elemento essencial para as plantas em geral, mas tem efeitos benéficos para o crescimento das plantas e produtividade em algumas espécies, enquanto o boro é indispensável para o crescimento da maioria das espécies de plantas (POMMERENIG et al., 2015).

1.4. Aquaporinas

Aquaporinas desempenham um papel central no transporte de água na planta, regulando o sistema de transporte de água na raiz para proteger contra uma variedade de estresses ambientais, além de facilitar o transporte de água através de tecidos foliares internos durante a transpiração (NGUYEN et al., 2013). O movimento da água e de outros solutos através de aquaporinas é um mecanismo passivo, conduzido pelo gradiente de concentração da molécula transportada (GOMES et al., 2009).

Mais de 30 membros da família das aquaporinas são encontrados em plantas superiores, por exemplo, 33 em arroz, 35 em *Arabidopsis* e 36 em milho (*Zea mays*). Aquaporinas pertencem à família das MIPs e são divididas em cinco subfamílias, com base nas especificidades de substrato e localizações subcelulares distintas: proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), proteínas intrínsecas tipo Nodulina 26 (NIPs), proteínas intrínsecas pequenas (SIPs) e as proteínas intrínsecas não caracterizadas (XIPs). Embora vários estudos tenham analisado esta família de genes em plantas, falta uma compreensão sistemática desta família, especialmente no arroz, uma planta modelo (NGUYEN, MOON e JUNG, 2013). As aquaporinas apresentam uma estrutura altamente conservada, formada por seis domínios transmembrana conectados por cinco *loops*, sendo as extremidades N e C terminal citoplasmáticas. Essa estrutura pode ser dividida em duas metades similares, chamadas hemiporos. As aquaporinas têm pesos moleculares médios entre 28 e 30 kDa (GOMES et al., 2009) e se organizam em tetrâmeros nas membranas, sendo que cada poro é independente (Figura 4).

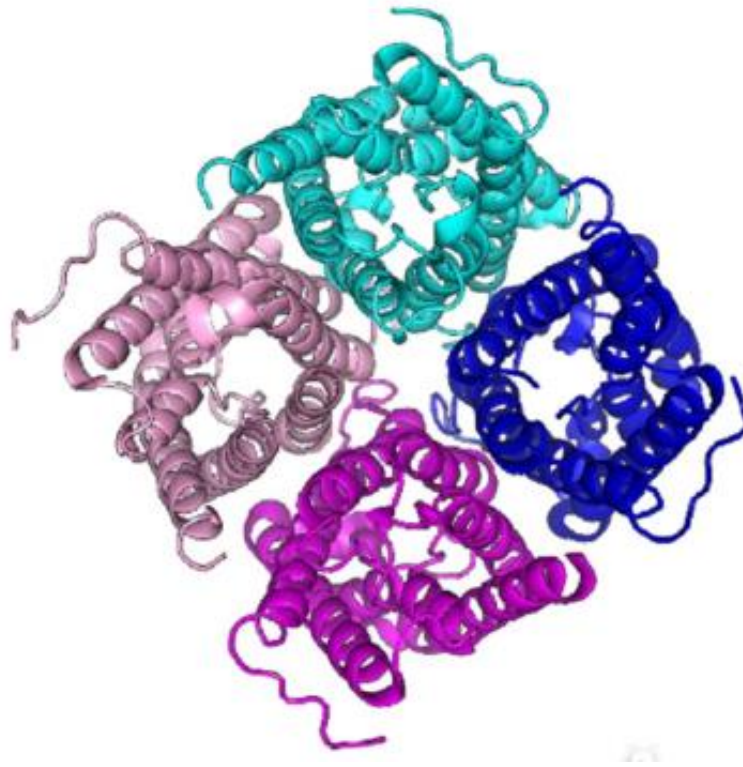


Figura 4. Estrutura tridimensional de uma aquaporina. As aquaporinas são agrupadas como tetrâmeros em membranas biológicas. Figura adaptada de Gomes, 2009.

As NIPs medeiam o transporte de uma variedade de pequenas moléculas neutras, incluindo amônia, ureia, ácido bórico e ácido silícico. Enquanto a permeabilidade aos ácidos bórico e silícico é restrita a alguns membros de NIPs, a permeabilidade ao As^{III} é generalizada em diferentes subclasses de NIPs (ZHAO, MCGRATH e MEHARG, 2010). Estudos recentes mostraram que várias aquaporinas de planta pertencentes às NIPs são permeáveis ao As^{III} (BASTÍAS e BELDARRAIN, 2016; BIENERT et al., 2008; LI et al., 2009; WANG et al., 2015; XU et al., 2015) e alguns membros das PIPs também podem estar envolvidos na tolerância e na permeabilidade de As^{III} em plantas de arroz (WANG et al., 2015). A expressão heteróloga de *OsPIPs* em *Arabidopsis* aumenta tanto o influxo quanto o efluxo de As^{III} nas raízes, indicando um transporte bidirecional de As^{III} por *OsPIPs* (WANG et al., 2015). *OsNIP2;1* (*Lsi1*) também é capaz de promover o efluxo de As^{III} de células de raízes de arroz para o meio externo. Esses estudos sugerem que as NIPs facilitam o movimento bidirecional de As^{III} nas plantas (MOSA et al., 2012; XU et al., 2015) (Figura 5).

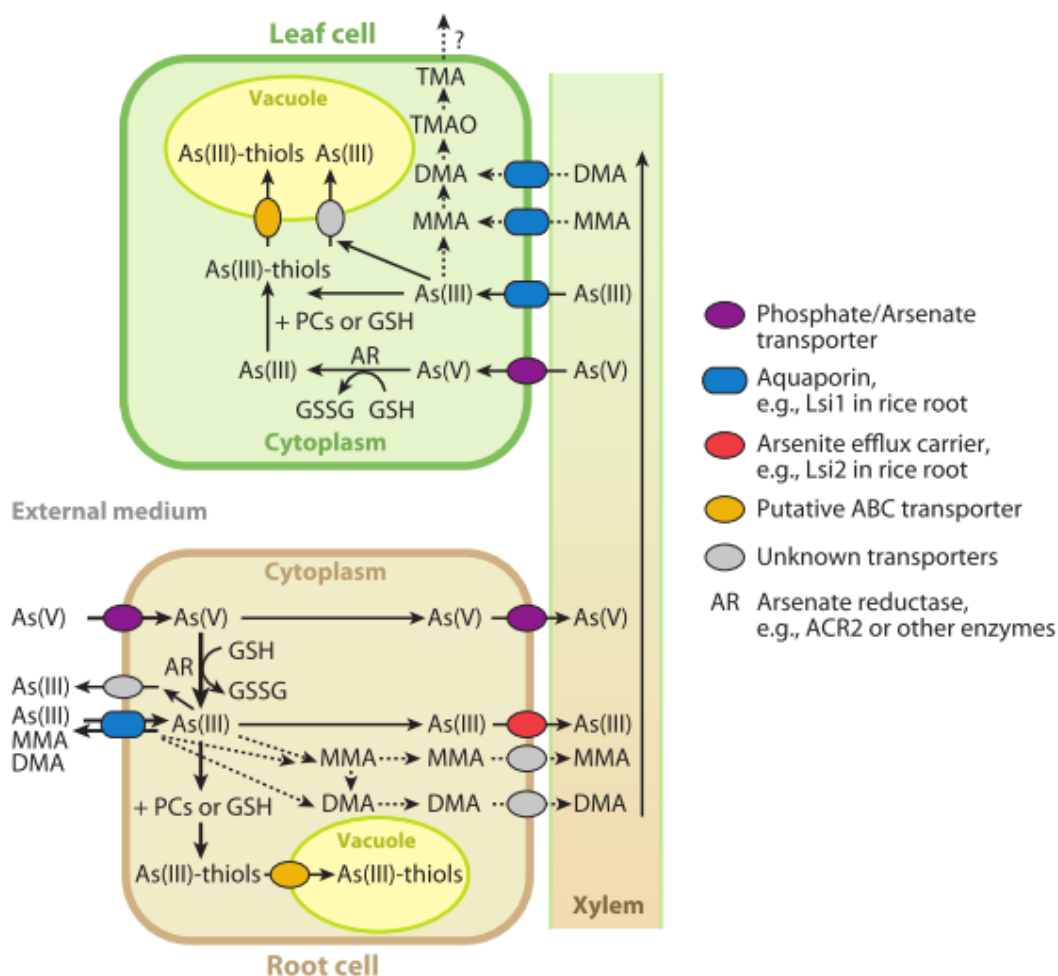


Figura 5. Diagrama esquemático simplificado do transporte e metabolismo do As nas plantas. A espessura das linhas de seta é indicativa do fluxo relativo. Os transportadores para a absorção de As em células foliares são considerados semelhantes aos das raízes, mas há pouco conhecimento de suas identidades. Os pontos de interrogação indicam grandes lacunas de conhecimento. ABC, cassete de ligação a ATP; ACR, resistência a compostos de arsênio; GSSG, glutathiona oxidada; GSH, glutathiona; Lsi, Transportador de influxo de Si; PC, fitoquelatina. Lsi1 é responsável pelo transporte bidirecional de As (orgânico e inorgânico) nas raízes e também transporta As nas folhas. Ainda não se sabe se as aquaporinas têm algum envolvimento no transporte de As para dentro do vacúolo e para os grãos. Figura adaptada de ZHAO, MCGRATH e MEHARG, 2010.

Embora estudos recentes tenham fornecido informações sobre a função fisiológica de vários membros da família das aquaporinas, ainda não existem estudos relacionando cultivares com tolerância/sensibilidade diferencial ao As e as aquaporinas expressas por estes cultivares.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar o envolvimento das aquaporinas no transporte de arsênio em arroz.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a influência do arsênio durante o desenvolvimento das cultivares de arroz.
- Investigar o perfil de expressão de genes de aquaporinas nas cultivares de arroz de interesse, submetidas a diferentes condições de crescimento.
- Avaliar a capacidade das aquaporinas de transportar diferentes semimetais (boro, silício, arsênio e antimônio).

3. Materiais e Métodos

3.1. Material vegetal e condições de crescimento

Para o ensaio hidropônico, sementes de arroz das cultivares Br-IRGA 409 e IRGA 424, já descritas como cultivar sensível e tolerante ao As, respectivamente) (FARIAS et al., 2017), provenientes do IRGA (Instituto Rio-Grandense do Arroz), foram germinadas em papel filtro embebido com o composto antifúngico 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxa-inil-3-carboxanilida (VITAVAX-THIRAM 200 SC) a 28 °C no escuro durante 24 h, seguidas por cinco dias com ciclo claro de 12 h ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

A seguir as plântulas foram transferidas para vermiculita embebida com solução nutritiva (RICACHENEVSKY et al., 2011), onde permaneceram por sete dias (Figura 6).



Figura 6. Plântulas de arroz crescendo em vermiculita embebida com solução nutritiva. Legenda incompleta. O entendimento da figura deve ser independente do texto.

Em seguida, as plântulas foram transferidas para copos de plástico (seis plântulas por copo) com 500 mL de solução nutritiva, pH 5,4, que foi renovada a

cada dois dias (Figura 7).



Figura 7. Plântulas de arroz em copos de plástico contendo solução nutritiva, pH 5,4.

Quando as plantas estavam no estágio de quatro folhas (aproximadamente 24 dias de crescimento), foram transferidas para uma nova solução nutritiva contendo $100 \mu\text{M}$ de As^{III} . Um grupo controle foi mantido na solução nutritiva sem arsênio. As plantas foram coletadas após 0, 24 h e 5 dias de tratamento. As raízes e a parte aérea foram separadas cortando 1 cm abaixo e acima dos cotilédones, respectivamente, e armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, até processamento posterior.

Para germinação em meio nutritivo, as sementes foram esterilizadas com etanol 70% durante 30 minutos e hipoclorito de sódio 1% por 10 min, lavadas três vezes com água destilada e germinadas em meio nutritivo Murashige & Skoog (MS) com $10 \mu\text{M}$ As^{III} ou meio nutritivo controle, pH 5,4.

As plântulas foram coletadas após 24 h e sete dias de tratamento, e armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, até processamento posterior.

3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o kit de purificação de RNA GeneJet Plant (ThermoFischer Scientific), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram então tratadas com DNase para eliminar qualquer contaminação por DNA. A síntese de cDNA a partir do RNA total foi realizada com o kit *cDNA RevertAid First Strand* (ThermoFischer Scientific), seguindo as instruções do fabricante, usando primers oligo (dT).

3.3. Análise de perfil de expressão

Foram realizadas análises de PCR quantitativo (qPCR) em tempo real para comparar os níveis de expressão dos genes de aquaporinas em resposta ao tratamento com As^{III}. Os *primers* específicos para os 33 genes de aquaporinas e *LSi2* foram projetados usando o programa Primer-BLAST (Tabela 1). Para normalizar a quantidade de RNA presente em cada amostra foi utilizado o gene da *ubiquitina 5 (UBQ5)* como gene de referência. A reação foi realizada no termociclador Eco (Illumina), usando o kit qPCR-Sybr Green (Ludwig Biotec) e os seguintes parâmetros: 95 °C por 5 min (desnaturação inicial) e 40 ciclos de 95 °C durante 10 s (desnaturação), 60 °C durante 15 s (anelamento), 72 °C por 15 s (extensão). As curvas de *melting* foram realizadas no final de cada reação, com temperaturas variando de 55 a 95 °C (incrementos de 0,1 °C/s). Todas as amostras de cDNA foram diluídas 1:20. As reações foram realizadas em quadruplicatas técnicas de duas repetições biológicas independentes, que consistiam de *pools* de 4 - 6 plantas para cada condição de crescimento. A análise dos dados foi realizada por quantificação comparativa usando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1. Sequência de *primes* de genes de aquaporinas, *LSi2* e *UBQ5* usados para RT-PCR e real-time PCR.

Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>OsNIP1;1</i>	catcctgcttaacgtgctga	gttcatccggttcatgctct
<i>OsNIP1;2</i>	gctgacacagatccatggtg	gactagcaccatgacgacga
<i>OsNIP1;3</i>	aatggccagcatgaagaaac	aggaagaacgtccccaagat
<i>OsNIP1;4</i>	tacctcacacgtcagggt	cacatattctcgcctatcacc
<i>OsNIP2;1</i>	ccagcaacaactcgagaaca	gatatgagacaggtcgct
<i>OsNIP2;2</i>	tcaccgtcatgatctacgcca	aacacctcgatcgggtacag
<i>OsNIP3;1</i>	acgacaggagggtcgatga	gcgcgatcaggatatccac
<i>OsNIP3;2</i>	gcatccagtagacctccaa	ggtaggacagcactgtgaaga
<i>OsNIP3;3</i>	ccacaggattgacagcaatg	tgtgcaaagaactcagcac
<i>OsNIP4;1</i>	aggagatgtacgggacgctga	gtgccgtagaagtggctgt
<i>OsPIP1;1</i>	agcagttacttttgggctgtt	caccaagaccgtcacccttgg
<i>OsPIP1;2</i>	gctccgacgacaaggactac	tggccatgaactcggcgat
<i>OsPIP1;3</i>	aggagaaggactaccggga	atcaccgtcaggatgctgat
<i>OsPIP2;1</i>	agagcgcctactcaacagg	aacgggcccagccagaagat
<i>OsPIP2;2</i>	tctgtccagcactagatcaacg	caccagcgggaagcaacat
<i>OsPIP2;3</i>	ctggatgcatgaccggag	gagcaaacaattatgcagc
<i>OsPIP2;4</i>	ggttccagagctcgctcta	attggcagcggagccaaca
<i>OsPIP2;5</i>	tgacgttcggcctcttct	gccgtacctgtcgtagaacg
<i>OsPIP2;6</i>	accacgtaagctgctcacct	atgtactggtgatacggcg
<i>OsPIP2;7</i>	gtgccaccatattcgtctc	ttcatgatcccctgacgat
<i>OsPIP2;8</i>	cacccattttaatcccatg	gctagattacgtacagacag
<i>OsSIP1;1</i>	aatcccatcgtcaagacctg	gtgtgtggcgattgttcac
<i>OsSIP2;1</i>	gggtcgattcttgagtgaa	caaccctcagctaacgctc
<i>OsTIP1;1</i>	tgacccaagaaggcag	agacgaggcgatcatggaaa
<i>OsTIP1;2</i>	gaacatcagcctgggaagg	catgacgatctcgaacacca
<i>OsTIP2;1</i>	gcaactcgcctggcaactg	ttaagcgtagtctctggcgg
<i>OsTIP2;2</i>	gttgccagcagcgagtct	ctcatccaactgctccaca
<i>OsTIP3;1</i>	gcgacctccagctacaatc	cactggtagctcactgttc
<i>OsTIP3;2</i>	cgccaccactgggttact	cacgggaagccgagtatct
<i>OsTIP4;1</i>	ctggatctactggctcggg	tatacagcccttacaggccta
<i>OsTIP4;2</i>	tcacgtgaggtccacgtggctt	gtaccggcacatacacac
<i>OsTIP4;3</i>	tcgcggaatcacctcaccta	cgtagcccccattatcgtgt
<i>OsTIP5;1</i>	ctttgtttcatcgccgt	cagtagaagatggcgctcg
<i>OsPIP2;9</i>	aggtgacgtgtccactctc	tacagggaccacctgcaca
<i>OsLsi2</i>	caagttcctcatgggaatcctcc	tcgttatgttctccgacatctcc
<i>OsUBQ5</i>	accacttcgaccgacctact	acgctaagcctgctgggt

3.5. Teste de complementação funcional em levedura

Os ensaios de complementação funcional em levedura foram realizados de acordo com LIU (2003). A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* YLL043W (BY4742; MAT α ; *ura3* Δ 0; *leu2* Δ 0; *his3* Δ 1; *lys2* Δ 0; YLL043w; *kanMX4*), com deleção do gene de aquaporina *Fsp1*, foi obtida de EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis - Universidade Johann Wolfgang Goethe, Alemanha). Esta linhagem tem o genótipo Δ *ura3*, não sendo capaz de crescer em meio deficiente em uracila. Os genes da aquaporina *OsPIP2;3* e do transportador *LSi2* foram clonados no plasmídeo pYES2 (Invitrogen), através de serviço prestado pela empresa GenScript. O plasmídeo pYES2 contém o gene *ura3* como marca de seleção. O choque térmico foi utilizado para transformar células de levedura com o plasmídeo contendo a construção desejada. Os transformantes foram selecionados em cultura na ausência de uracila e a confirmação da transformação foi feita por PCR convencional. Para manutenção e crescimento das leveduras transformadas foi utilizado meio sintético mínimo sem uracila (YNB 0,68%, Sigma-Aldrich *Yeast Synthetic Drop-out Media Supplement* 0,08% e glicose 2%), substituindo a glicose por rafinose 2% e galactose 1% para expressão dos genes de interesse. Para os meios sólidos foi adicionado 2% de ágar.

Um clone recombinante para cada gene de interesse ou contendo o vetor vazio (controle) foi utilizado para testes de transporte de arsênio, boro, silício e antimônio. As células foram crescidas em meio líquido por 18 h a 30 °C e diluídas para obtenção de absorbância 0,5 (em comprimento de onda de 600 nm). Foram realizadas diluições seriadas (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) e plaqueamento em meio sintético mínimo sem uracila complementado com as substâncias teste. O crescimento das leveduras foi acompanhado por até cinco dias de incubação a 30 °C.

4. Resultados e discussão

4.1. Testes de tolerância ou de sensibilidade das cultivares ao As^{III}

Estudos com o As^V têm demonstrado que as espécies de plantas não resistentes ao As sofrem um estresse considerável após a exposição, com sintomas que vão desde a inibição do crescimento da raiz até a morte (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002). Ocasionalmente, as plantas podem crescer em ambientes contendo As sem exibir sintomas visíveis. No entanto, a exposição das plantas a este elemento pode causar alterações sutis, como diferenças nas concentrações de nutrientes nos tecidos das plantas. A marcante susceptibilidade das plantas de arroz ao As pode ser devida a uma pequena biomassa, que resulta em alta concentração de As no tecido vegetal, levando a níveis tóxicos de As, que afetam drasticamente o desenvolvimento (FARIAS et al., 2017).

O presente estudo demonstrou que a exposição a níveis mais elevados de As levou a uma diminuição da produção de biomassa das plantas de arroz durante o estágio de desenvolvimento vegetativo, conforme relatado anteriormente por BHATTACHARYA et al. (2009). A cultivar BR-IRGA 409 apresentou maiores valores de massa comparado ao IRGA 424, na ausência de As. No entanto, a cultivar IRGA 424 apresentou a maior tolerância à exposição ao As, com um potencial interessante para estudos. A exposição ao As teve efeitos significativos na redução do peso seco das plântulas da cultivar BR-IRGA 409, afetando tanto a produção de biomassa quanto o sistema radicular (Figura 8). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que demonstraram que o cultivar IRGA 424 apresentou maiores valores de massa seca de raiz e parte aérea, bem como comprimento total de raiz e número de pontas de raízes em relação a BR-IRGA 409, após exposição ao As (FARIAS et al., 2017). Este mesmo estudo relatou diferenças no acúmulo de As nas cultivares IRGA 424 e BR-IRGA 409, sendo que a cultivar BR-IRGA 409 acumulou mais As no tecido principal, mostrando baixa translocação de As para os perfilhos.

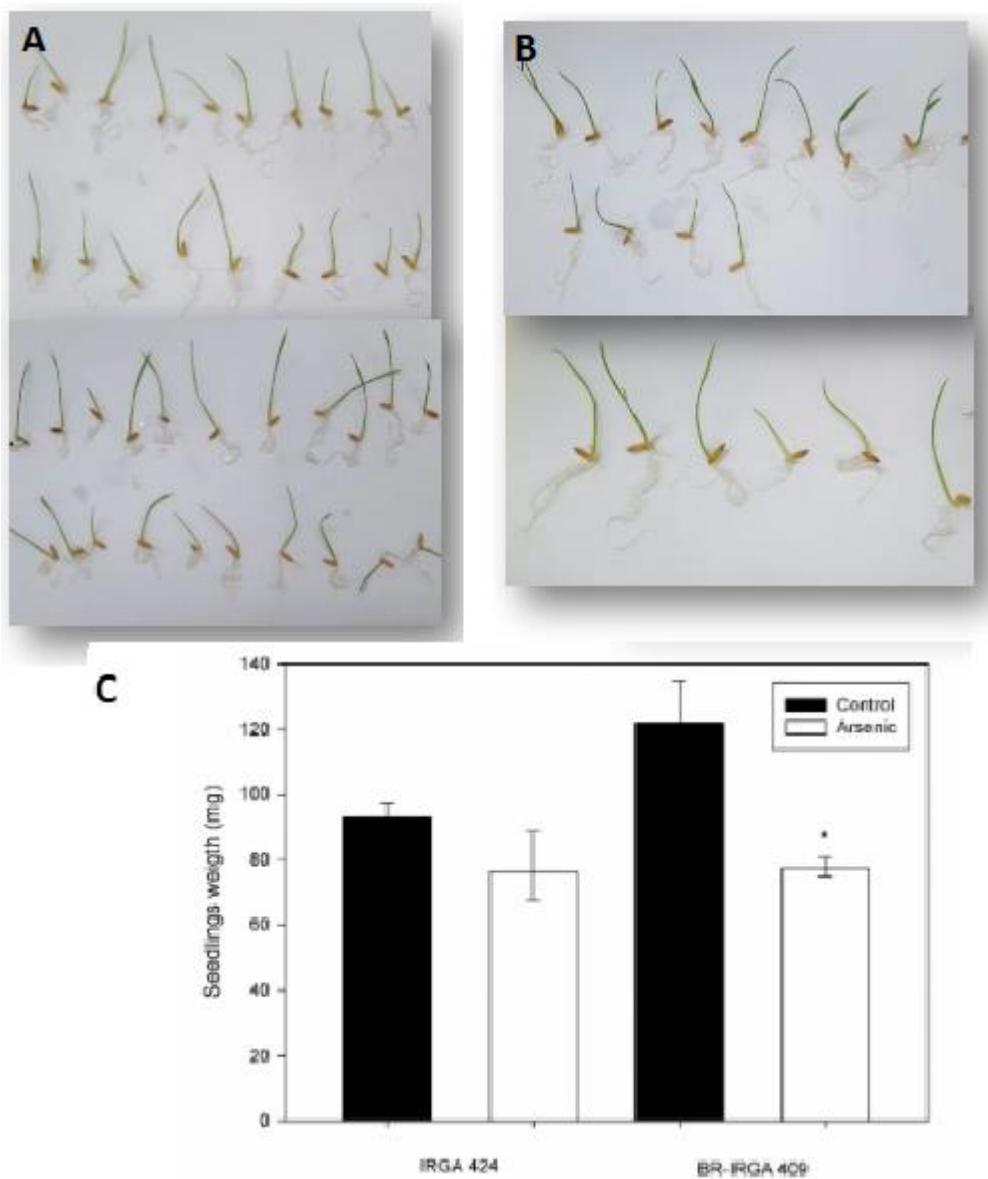


Figura 8. A) Plântulas de arroz da cultivar IRGA 424 após sete dias de germinação. Plântulas na parte superior suplementadas com 10 μM As^{III} e abaixo sem As^{III} . B) Plântulas de arroz da cultivar BR-IRGA 409 após sete dias de germinação. Plântulas na parte superior suplementadas com 10 μM As^{III} e abaixo sem As^{III} . C) Peso seco das plântulas dos cultivares IRGA 424 e BR-IRGA 409 germinadas com 10 μM As^{III} e sem As^{III} .

4.2. Análise de expressão gênica em resposta ao tratamento com As^{III}

Análises de q-PCR foram conduzidas para investigar a expressão dos genes que codificam as aquaporinas de arroz em raízes e parte aérea de plantas de arroz de diferentes cultivares expostas ao As^{III}.

Depois de transferir as plântulas para uma solução nutritiva contendo As^{III} 100 µM durante 24 h, dos 33 genes de aquaporinas analisados, 14 apresentaram variações nos níveis de expressão, em pelo menos uma das cultivares. Na cultivar tolerante ao As (IRGA 424), três genes (*OsNIP3;2*, *OsTIP1;1*, *OsPIP2;9*) na parte aérea e três genes (*OsNIP3;2*, *OsPIP2;9*, *OsSIP2;1*) na raiz tiveram a expressão aumentada em resposta ao tratamento. Por outro lado, na raiz, dois genes (*OsPIP1;3* e *OsPIP2;2*) apresentaram expressão reduzida em resposta ao tratamento. Na raiz do cultivar sensível ao As (Br-IRGA 409), um gene (*OsPIP1;3*), teve a expressão aumentada e dois genes (*OsPIP2;2* e *OsPIP2;9*) apresentaram expressão reduzida em resposta ao tratamento. Já na parte aérea, somente um gene (*OsPIP2;2*) foi influenciado pelo tratamento, tendo sua expressão reduzida. A alteração mais drástica na expressão foi observada em *OsPIP2;9* (*fold change*: 100) (Figura 9).

Os resultados de expressão gênica obtidos indicam que as aquaporinas apresentam perfil de expressão diferencial entre os cultivares sensível e tolerante ao As: *OsPIP1;3* apresenta expressão aumentada na raiz do cultivar sensível e expressão reduzida na raiz do cultivar tolerante, já o gene *OsPIP2;9* apresenta um perfil contrário (Figura 9).

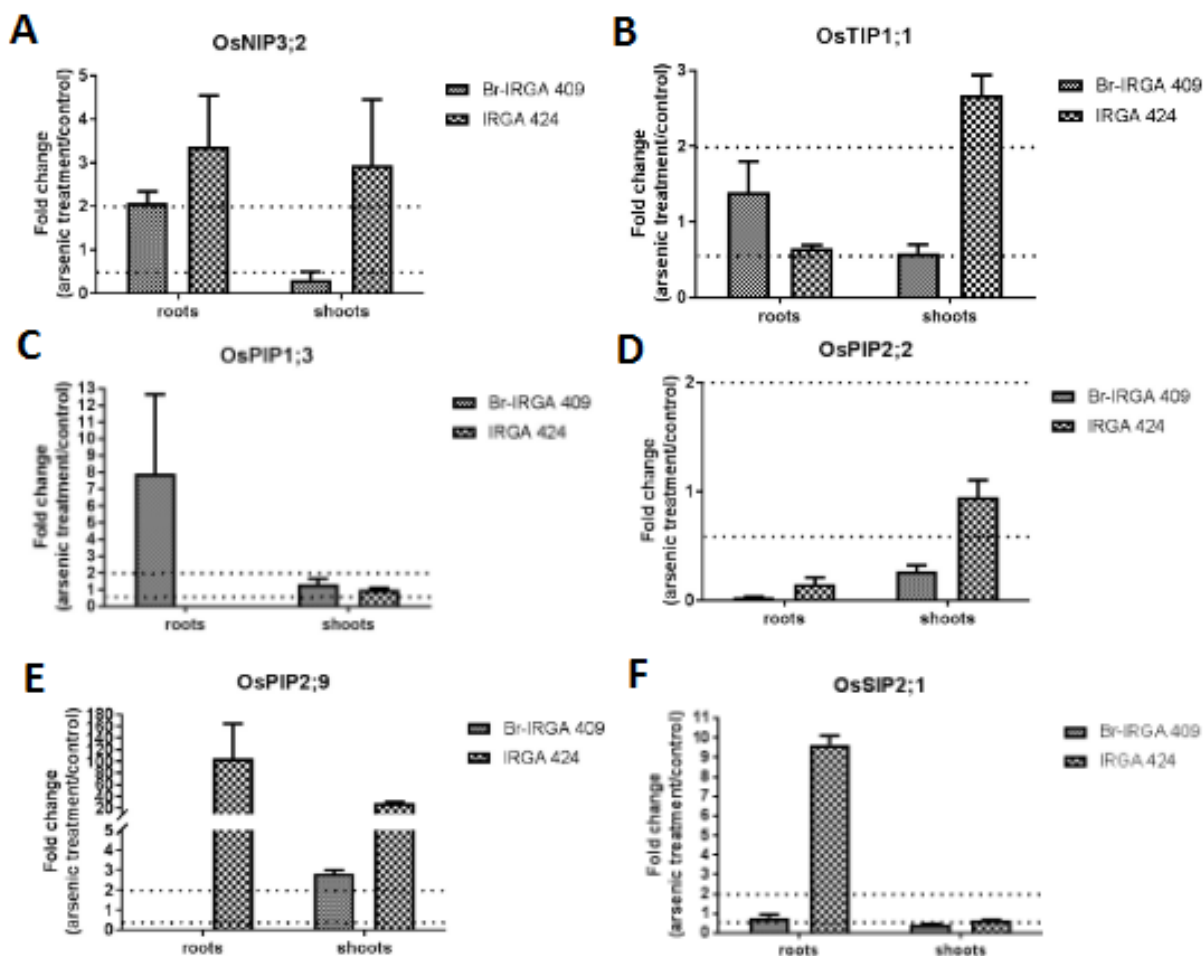


Figura 9. Nível de expressão de genes de aquaporinas em raízes e partes aéreas de plantas de arroz das cultivares BR-IRGA 409 e IRGA 424 depois de crescimento hidropônico com 100 μM As^{III} por 24 h. A) *OsNIP3;2* B) *OsTIP1;1* C) *OsPIP1;3* D) *OsPIP2;2* E) *OsPIP2;9* F) *OsSIP2;1*. Os resultados do qPCR são mostrados como *fold change* em relação ao tratamento controle (sem As).

Experimentos em meio nutritivo foram conduzidos para investigar as respostas ao As^{III} durante a germinação das sementes. Após 24 horas de germinação em meio nutritivo contendo 10 μM As^{III} , dos 33 genes analisados, seis apresentaram variações nos níveis de expressão, em pelo menos uma cultivar testada. Na IRGA 424, dois genes (*OsTIP3;2* e *OsPIP2;5*) apresentaram expressão aumentada em resposta ao tratamento e um gene (*OsSIP2;1*) teve a expressão reduzida. Já na BR-IRGA 409, um gene (*OsSIP1;1*) apresentou expressão aumentada e três genes (*OsTIP3;2*, *OsPIP2;5* e *OsSIP2;1*) apresentaram expressão reduzida em resposta ao tratamento.

Os genes *OsTIP3;2* e *OsPIP2;5* apresentam expressão aumentada nas plântulas da cultivar tolerante e reduzida nas plântulas do cultivar sensível. Em contrapartida, *OsSIP1;1* apresentou expressão aumentada nas plântulas da cultivar sensível e reduzida nas plântulas da cultivar tolerante (Figura 10). Em 24 horas após a exposição ao As^V , o efluxo de As^{III} já foi demonstrado ser aproximadamente três vezes a quantidade de As acumulado nas plantas, sugerindo um ciclo rápido de As entre as raízes das plantas e o meio (ZHAO, MCGRATH e MEHARG, 2010). Já é descrito também que a frequência de indivíduos resistentes é maior na semente do que em plantas adultas (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002).

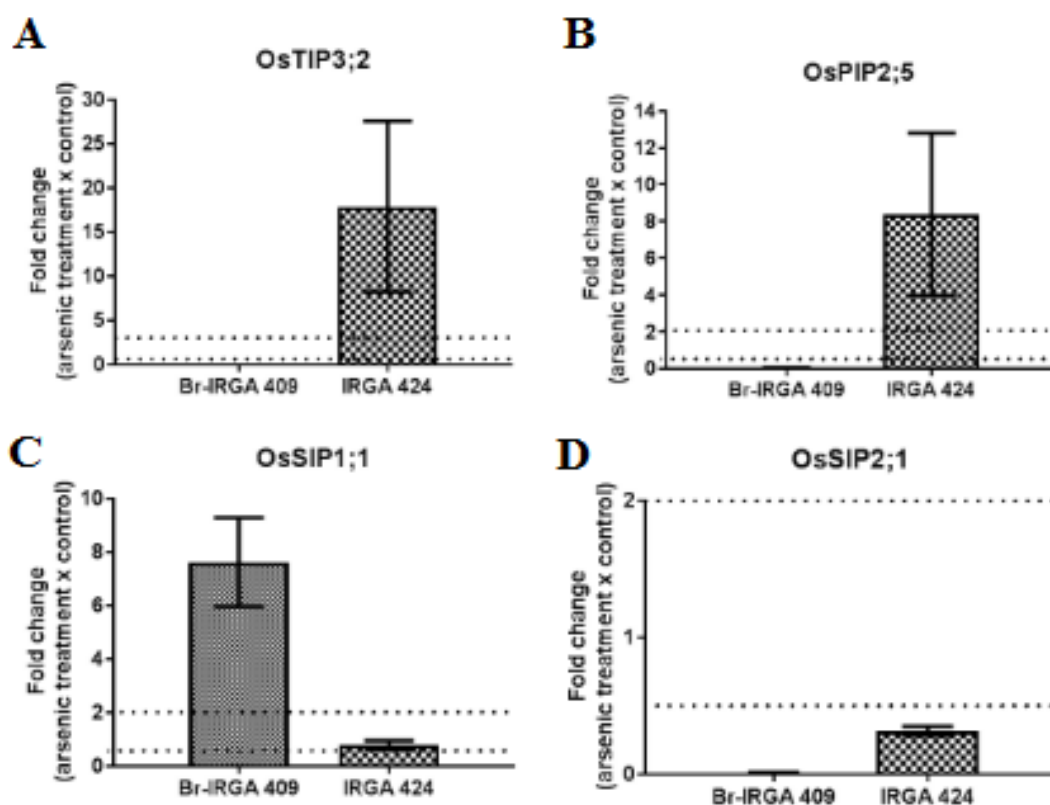


Figura 10. Nível de expressão de genes de aquaporinas em sementes de arroz das cultivares BR-IRGA 409 e IRGA 424 em germinação em meio com $10 \mu M As^{III}$ por 24 horas. A) *OsTIP3;2*, B) *OsPIP2;5*, C) *OsSIP1;1*, D) *OsSIP2;1*. Os resultados do qPCR são mostrados como *fold change* em relação ao controle (sem As).

Após sete dias de crescimento de plântulas em meio nutritivo contendo $10 \mu M As^{III}$, dos 33 genes analisados, nove apresentaram variações nos níveis de

expressão, em pelo menos uma cultivar testada. Em IRGA 424, dois genes (*OsNIP3;2* e *OsPIP1;1*) apresentaram expressão aumentada em resposta ao tratamento e um gene (*OsPIP2;3*) teve a expressão reduzida. Já em BR-IRGA 409, três genes (*OsPIP1;1*, *OsPIP2;3* e *OsSIP2;1*) apresentaram expressão aumentada e nenhum gene teve expressão reduzida em resposta ao tratamento. A mudança mais drástica na expressão foi observada em *OsPIP2;3* (*fold change*: 90). *OsPIP2;3* e *OsSIP2;1* apresentam expressão aumentada nas plântulas do cultivar sensível e reduzida nas plântulas do cultivar tolerante (Figura 11).

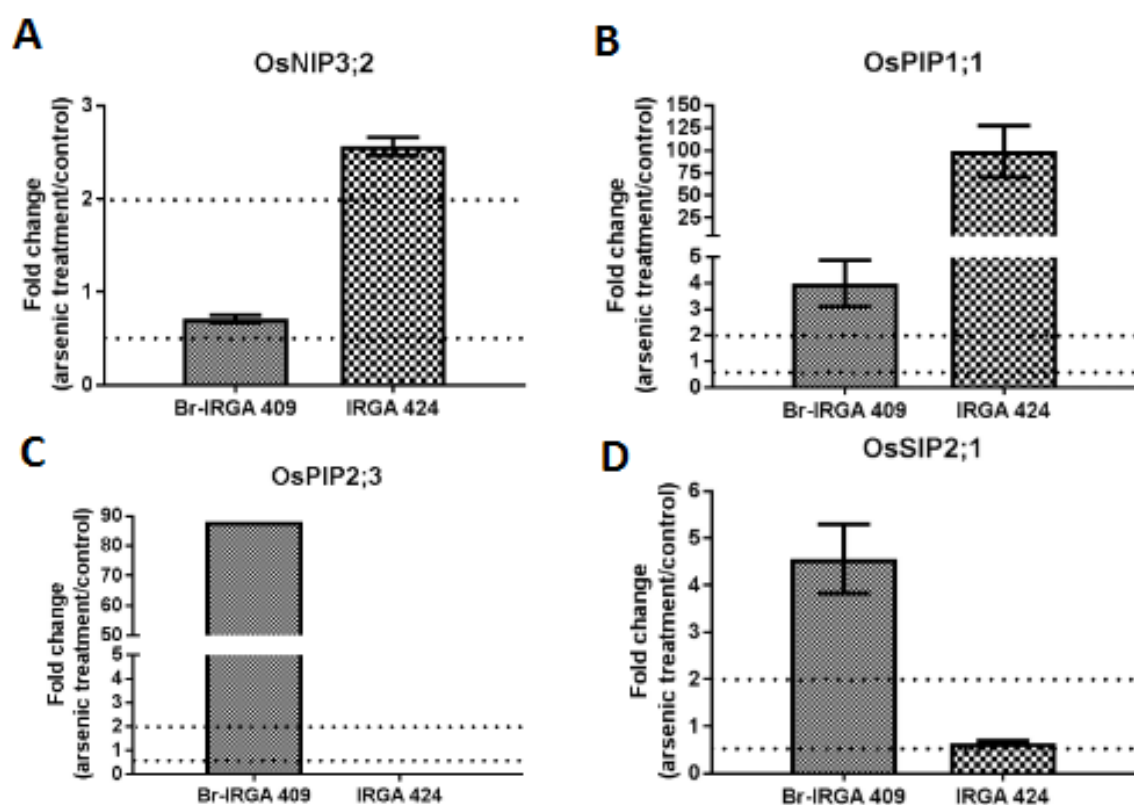


Figura 11. Nível de expressão de genes de aquaporinas em plântulas de arroz das cultivares BR-IRGA 409 e IRGA 424 crescidas em meio nutritivo solidificado contendo $10 \mu\text{M As}^{\text{III}}$ por 7 dias. A) *OsNIP3;2*, B) *OsPIP1;1*, C) *OsPIP2;3*, D) *OsSIP2;1*. Os resultados do qPCR são mostrados como *fold change* em relação ao controle (sem As).

Compreender os caminhos e o mecanismo de transporte de As nas plantas permitirá o desenvolvimento de estratégias para reduzir o conteúdo de As em culturas alimentares importantes, como o arroz. Estudos recentes indicam que o principal caminho para o transporte do As^{III} no arroz é através da subfamília NIP (MOSA et al., 2012). Todos os membros da família aquaporina atualmente

conhecidos que transportam As^{III} pertencem à subfamília NIP. Além disso, a expressão heteróloga de *OsNIP2;1* e *OsNIP3;2* em levedura aumentou a sensibilidade ao As^{III} e o acúmulo de As (MOSA et al., 2012). Outras aquaporinas de plantas, como *AtNIP3;1*, *AtNIP5;1*, *AtNIP6;1* e *AtNIP7;1* de *Arabidopsis*; *PvTIP4;1* de *Pteris vittata* e *OsNIP3;2* de arroz, também transportam As^{III} bidirecionalmente, através de um processo passivo com a direção do fluxo dependendo do gradiente de concentração (CHEN et al., 2017b). Alguns dos genes *NIP* de arroz são expressos principalmente nos tecidos das folhas e inflorescências. Seus papéis no transporte de As em direção ao grão continuam a ser investigados (ZHAO, MCGRATH e MEHARG, 2010).

Transcritos do gene *OsNIP3;2* foram encontrados principalmente nas raízes primárias e na maioria das camadas celulares nas raízes laterais (ABERNATHY et al., 1999). Nossos dados suportam esses achados (Figura 9).

As PIPs possuem uma estrutura de poros estreita típica das aquaporinas ortodoxas e seletivas de água, e portanto não são preditas como permeáveis ao As^{III} (MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002). Na subfamília PIP, o gene *OsPIP2* foi expresso principalmente na raiz no estágio de semente, o que concorda com os dados de NGUYEN, MOON e JUNG (2013). Em nosso estudo, *OsPIP1;3*, *OsPIP2;2* e *OsPIP2;9* mostraram uma forte regulação na expressão de seus transcritos de mRNA em resposta ao As^{III} em raízes e parte aérea. Considerando os perfis de expressão de *OsPIPs* em resposta à presença de As^{III} , é provável que a subfamília *PIP* de arroz possa desempenhar algum papel na permeabilidade de As^{III} no arroz.

Neste estudo, demonstramos que, além dos membros da subfamília *NIP*, membros das subfamílias *PIP*, *TIP*, *SIP* também podem estar envolvidos no transporte e metabolismo de As em diferentes cultivares de arroz. A nossa hipótese é que *OsPIP1;3*, *OsPIP2;3*, *OsSIP1;1* e *OsSIP2;1* podem estar envolvidas no transporte de As para dentro da planta, enquanto *OsNIP3;2*, *OsPIP2;2*, *OsPIP2;5*, *OsPIP2;9*, *OsTIP1;1* e *OsTIP3;2* podem ser responsáveis por sequestrar As para os vacúolos, contribuindo para a tolerância dos cultivares (Figura 12).

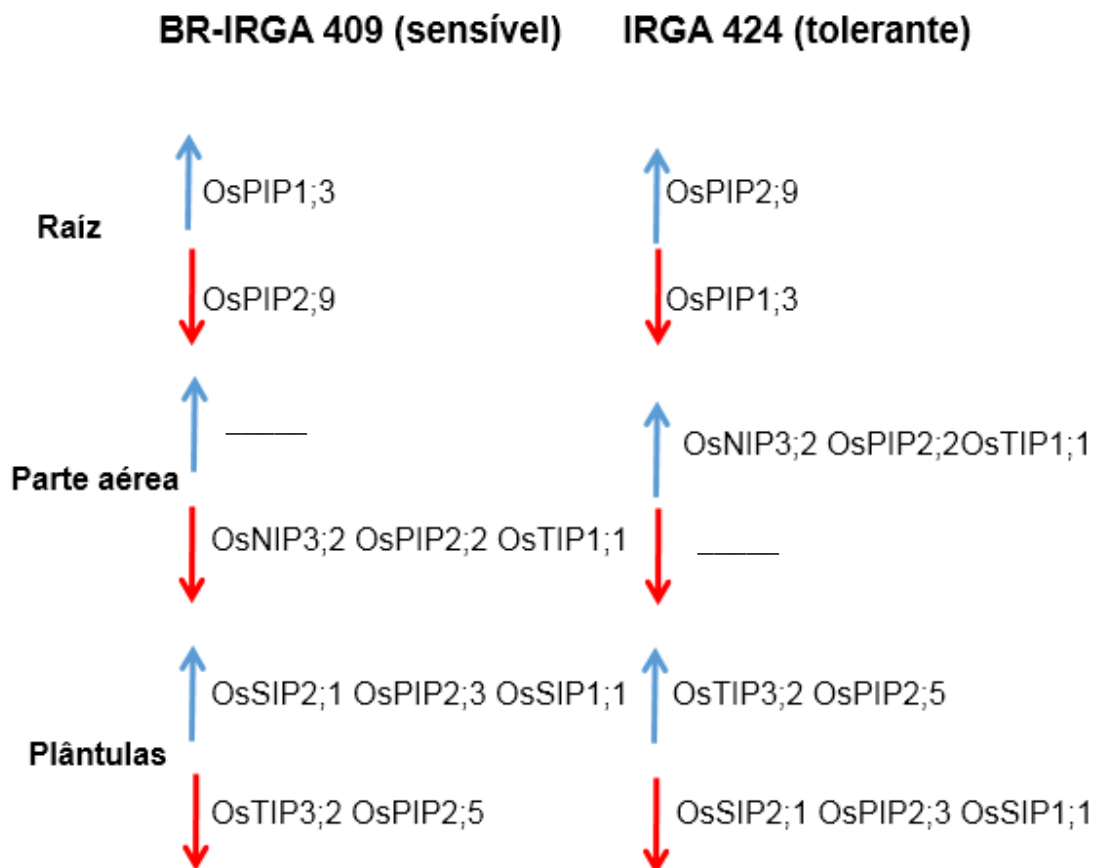


Figura 12. Diagrama esquemático das aquaporinas diferencialmente expressas entre os cultivares sensível e tolerante ao As e em diferentes tecidos. As setas azuis e vermelhas indicam, respectivamente, aumento e diminuição na expressão do gene, em relação ao controle (plantas não expostas ao arsênio).

4.3. Ensaios de complementação funcional

Com base no perfil de expressão diferencial dos genes das aquaporinas nas cultivares testadas, o gene *OsPIP2;3* foi selecionado para o ensaio de complementação funcional, visando avaliar a capacidade desta aquaporina em transportar As e outros semi-metais. Dentre os genes que apresentaram mudanças nos níveis de expressão após tratamento com As, *OsPIP2;3* é o único que apresenta expressão restrita às raízes (Figura 13 e S1-S5), de acordo com dados de expressão disponíveis no banco de dados BAR (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, <http://bar.utoronto.ca/>). Esta característica torna o gene um candidato

promissor para estudos futuros de silenciamento gênico, com o intuito de reduzir a absorção de As pelas plantas.



Figura 13. Expressão do gene *OsPIP2;3* (Os04g44060) em diferentes tecidos de arroz. Os dados foram obtidos do site BAR (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, <http://bar.utoronto.ca/>). A expressão foi normalizada em relação ao gene *Ubiquitina-5* (*UBQ5*, LOC_Os03g13170).

A sequência codificadora de *OsPIP2;3* foi sintetizada e clonada no vetor de expressão em leveduras pYES2. Além deste gene, o gene que codifica o transportador de silício *Lsi2*, que também é capaz de transportar As (CHEN et al., 2017b), também foi clonado para utilização como controle positivo do transporte de As pelas leveduras. Os genes de interesse foram inseridos na levedura *S. cerevisiae* YLL043W. Os ensaios de complementação funcional estão em andamento no presente momento.

5. Conclusões finais

Reduzir os níveis de As presente no arroz é uma questão de saúde pública. Os níveis e espécies de As variam muito em solos de cultivo de arroz em diferentes regiões, além de existir uma grande variação entre os diferentes cultivares de arroz. Durante a última década, a pesquisa de biologia molecular sobre como as plantas lidam com As abriu oportunidades sem precedentes para tornar os grãos de arroz mais seguros, reduzindo seu conteúdo de As. Estudos com plantas transgênicas podem direcionar a seleção de marcadores genéticos para obtenção de variedades de arroz com baixo nível de As. Além disso, a tecnologia de edição de genes, recentemente desenvolvida, também pode ajudar na alteração de genes específicos. É importante elucidar como o arroz e outras espécies de plantas metabolizam As, para que seja possível desenvolver plantas de arroz com baixo nível de As.

Em conclusão, nossos resultados indicam que os membros da subfamília *NIP*, *TIP*, *SIP* e *PIP* podem estar envolvidos no transporte de As^{III} em arroz, estando potencialmente envolvidos na resposta diferencial à toxicidade do As, observada em cultivares de arroz. A habilidade das aquaporinas de transportar semimetals tóxicos como As, faz com que essas proteínas sejam candidatas a estratégias de fitorremediação, assim como para bloquear a absorção de As em plantas para limitar a contaminação da cadeia alimentar. A fitorremediação tem sido proposta como uma metodologia alternativa na remoção de As de ambientes contaminados. Para isso as espécies vegetais utilizadas devem ser eficientes na retirada de grande quantidade de As do solo ou da água.

6. Perspectivas

Primeiramente, a caracterização funcional dos genes de aquaporinas diferencialmente expressos será realizada através dos ensaios de complementação funcional em leveduras. Uma vez finalizada a caracterização funcional das aquaporinas de arroz que transportam As, estas aquaporinas serão alvo para geração de plantas de arroz transgênicas silenciadas para a expressão dos genes de interesse, visando à análise do papel fisiológico destas proteínas no transporte e metabolismo de As, bem como no desenvolvimento da planta.

7. Referências bibliográficas

- ABERNATHY, C. O. et al. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. **Environmental health perspectives**, v. 107, n. 7, p. 593–7, 1999.
- ALVES, G.; SANTOS, D. O. S. Crescimento E Respostas Antioxidantes De Macrófitas Aquáticas Submetidas Ao Arsênio. **Dissertação**, 2006.
- BASTÍAS, J. M.; BELDARRAIN, T. Arsenic translocation in rice cultivation and its implication for human health. **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 1, p. 114–122, 2016.
- BATISTA, B. L. et al. Identification and quantification of phytochelatins in roots of rice to long-term exposure: Evidence of individual role on arsenic accumulation and translocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 6, p. 1467–1479, 2014.
- BHATTACHARYA, P. et al. Transfer of Arsenic from Groundwater and Paddy Soil to Rice Plant (*Oryza sativa* L .): A Micro Level Study in West Bengal , India. v. 5, n. 4, p. 425–431, 2009.
- BIENERT, G. P. et al. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. **BMC Biology**, v. 6, n. 1, p. 26, 2008.
- CHEN, Y. et al. The Nodulin 26-like intrinsic membrane protein OsNIP3;2 is involved in arsenite uptake by lateral roots in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 11, p. 3007–3016, 2017a.
- CHEN, Y. et al. Arsenic Transport in Rice and Biological Solutions to Reduce Arsenic Risk from Rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. March, 2017b.
- FARIAS, J. G. et al. Effect of phosphorus on arsenic uptake and metabolism in rice cultivars differing in phosphorus use efficiency and response. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 163–174, 2017.
- GOMES, D. et al. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 6, p. 1213–1228, 2009.
- LI, R.-Y. et al. The Rice Aquaporin Lsi1 Mediates Uptake of Methylated Arsenic Species. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 2071–2080, 2009.
- LIU, L.-H. Urea Transport by Nitrogen-Regulated Tonoplast Intrinsic Proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 133, n. 3, p. 1220–1228, 2003.
- 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, n. 4, p. 402–408, 2001.

MEHARG, A. A.; HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 29–43, 2002.

MEMBR, C. T. HHS Public Access. p. 1–28, 2015.

MOSA, K. A. et al. Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants. **Transgenic Research**, v. 21, n. 6, p. 1265–1277, 2012.

NGUYEN, M. X.; MOON, S.; JUNG, K. H. Genome-wide expression analysis of rice aquaporin genes and development of a functional gene network mediated by aquaporin expression in roots. **Planta**, v. 238, n. 4, p. 669–681, 2013.

NORTON, G. J. et al. Variation in grain arsenic assessed in a diverse panel of rice (*Oryza sativa*) grown in multiple sites. **New Phytologist**, v. 193, n. 3, p. 650–664, 2012.

POMMERENIG, B.; DIEHN, T. A.; BIENERT, G. P. Plant Science Metalloporins: Essentiality of Nodulin 26-like intrinsic proteins in metalloid transport. **Plant Science**, v. 238, p. 212–227, 2015.

RICACHENEVSKY, F. K. et al. ZINC-INDUCED FACILITATOR-LIKE family in plants: lineage-specific expansion in monocotyledons and conserved genomic and expression features among rice (*Oryza sativa*) paralogs. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 20, 2011.

SOURI, Z.; KARIMI, N.; SANDALIO, L. M. Arsenic Hyperaccumulation Strategies: An Overview. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. July, p. 1–8, 2017a.

SOURI, Z.; KARIMI, N.; SANDALIO, L. M. Arsenic Hyperaccumulation Strategies: An Overview. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. July, p. 1–8, 2017b.

WANG, X. et al. Recent advances in arsenic bioavailability, transport, and speciation in rice. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 5742–5750, 2015.

WILLIAMS, P. N. et al. Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 16, p. 4903–4908, 2006.

XU, W. et al. Arabidopsis NIP3;1 plays an important role in arsenic uptake and root-to-shoot translocation under arsenite stress conditions. **Molecular Plant**, v. 8, n. 5, p. 722–733, 2015.

YE, Y. et al. OsPT4 Contributes to Arsenate Uptake and Transport in Rice. v. 8, n. December, p. 1–12, 2017.

ZAVALA, Y. J.; DUXBURY, J. M. Arsenic in Rice : I . Estimating Normal Levels of Total Arsenic in Rice Grain Arsenic in Rice : I . Estimating Normal Levels of Total

Arsenic in Rice Grain. v. 42, n. April, p. 3856–3860, 2008.

ZHAO, F.-J.; MCGRATH, S. P.; MEHARG, A. A. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 535–559, 2010.

ZHAO, F. J.; MEHARG, A. A.; MCGRATH, S. P. Arsenic uptake and metabolism in plants. n. 2008, p. 777–794, 2009.

8. Apêndice – Figuras Suplementares

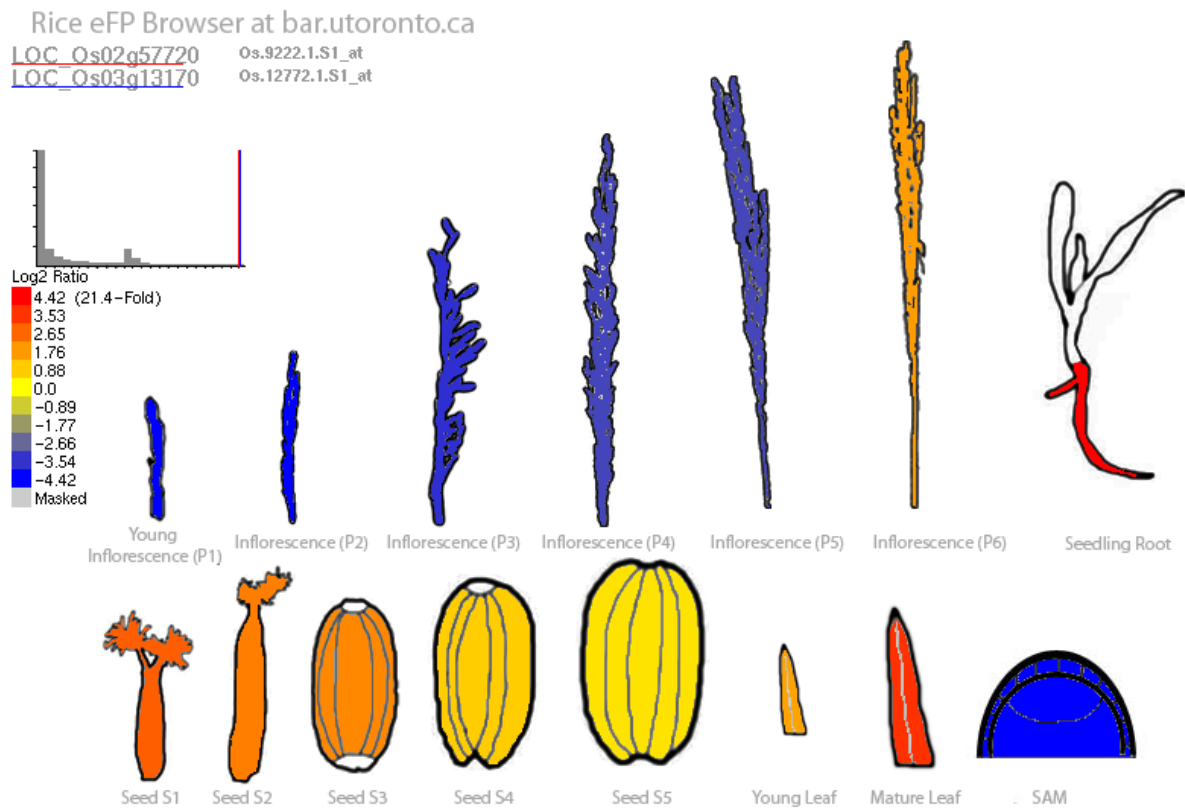


Figura S1. Expressão do gene *OsPIP1;3* (Os02g57720) em diferentes tecidos de arroz. Os dados foram obtidos do site BAR (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, <http://bar.utoronto.ca/>). A expressão foi normalizada pelo gene da *Ubiquitina-5* (*UBQ5*, LOC_Os03g13170).

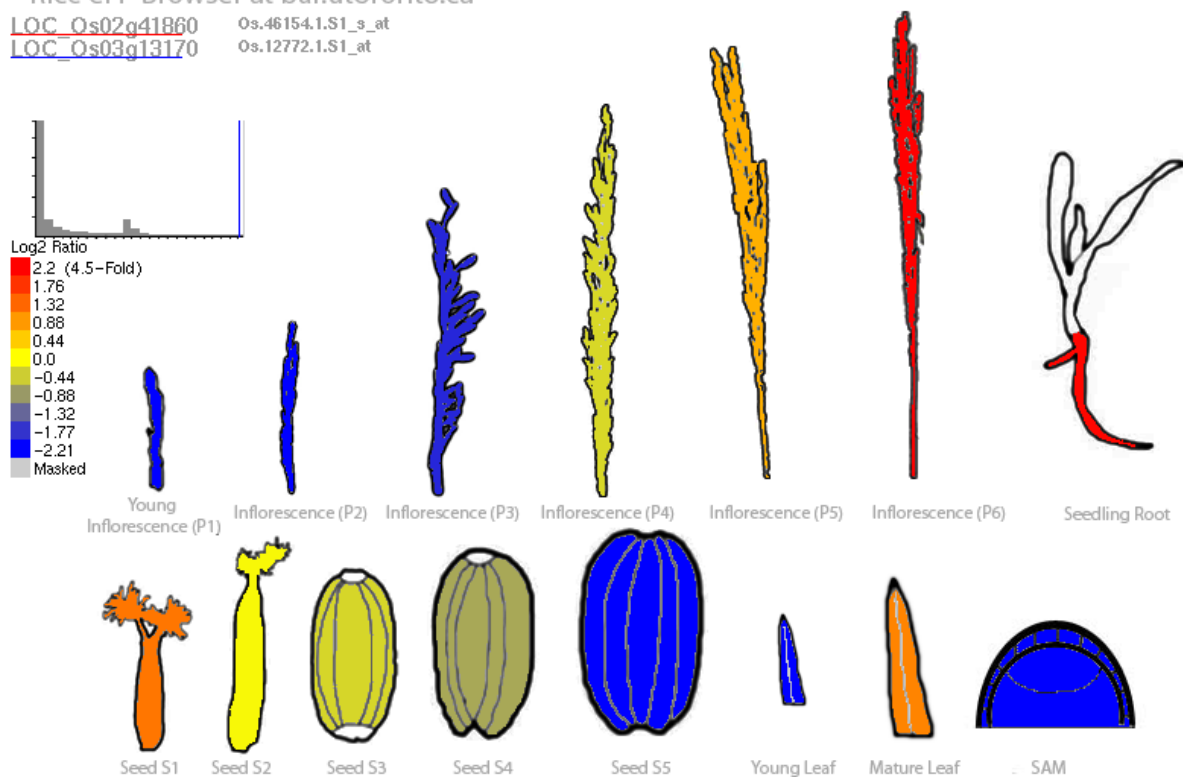


Figura S2. Expressão do gene *OsPIP2;2* (Os02g41860) em diferentes tecidos de arroz. Os dados foram obtidos do site BAR (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, <http://bar.utoronto.ca/>). A expressão foi normalizada pelo gene da *Ubiquitina-5* (*UBQ5*, LOC_Os03g13170).

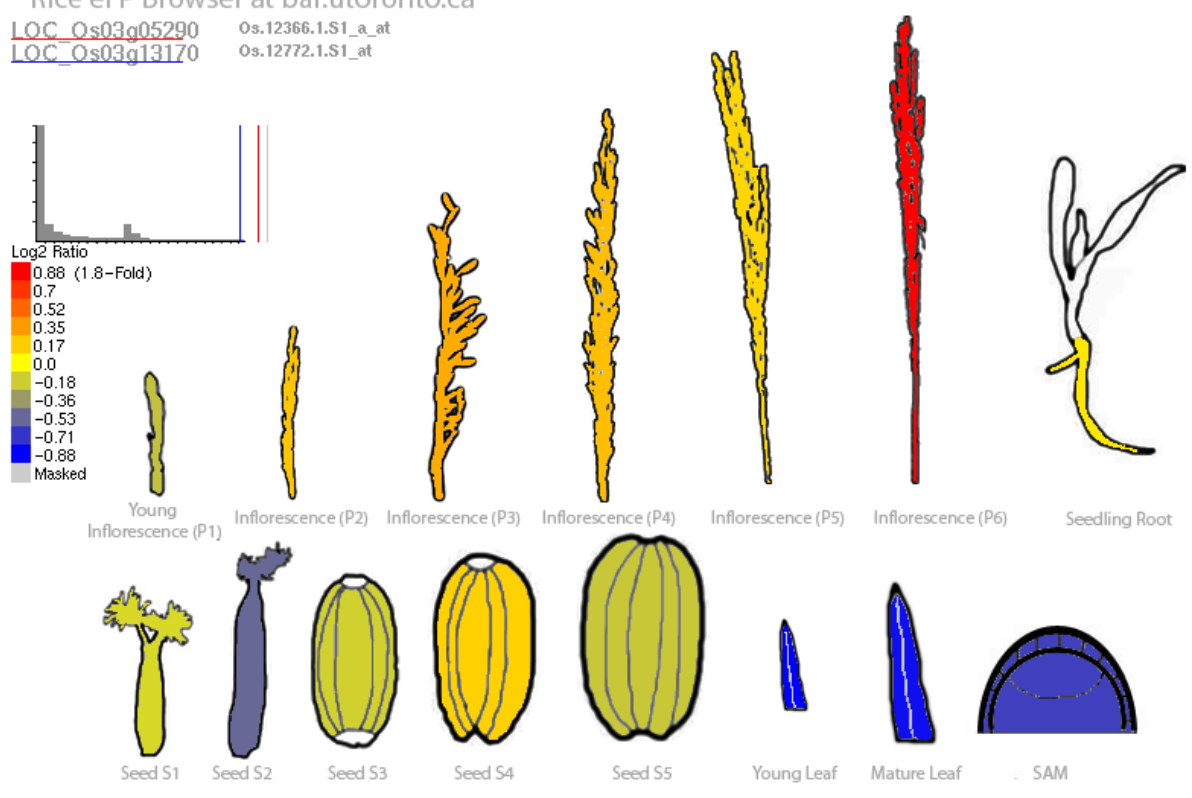


Figura S3. Expressão do gene *OsTIP1;1* (Os03g05290) em diferentes tecidos de arroz. Os dados foram obtidos do site BAR (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, <http://bar.utoronto.ca/>). A expressão foi normalizada pelo gene da *Ubiquitina-5* (*UBQ5*, LOC_Os03g13170).

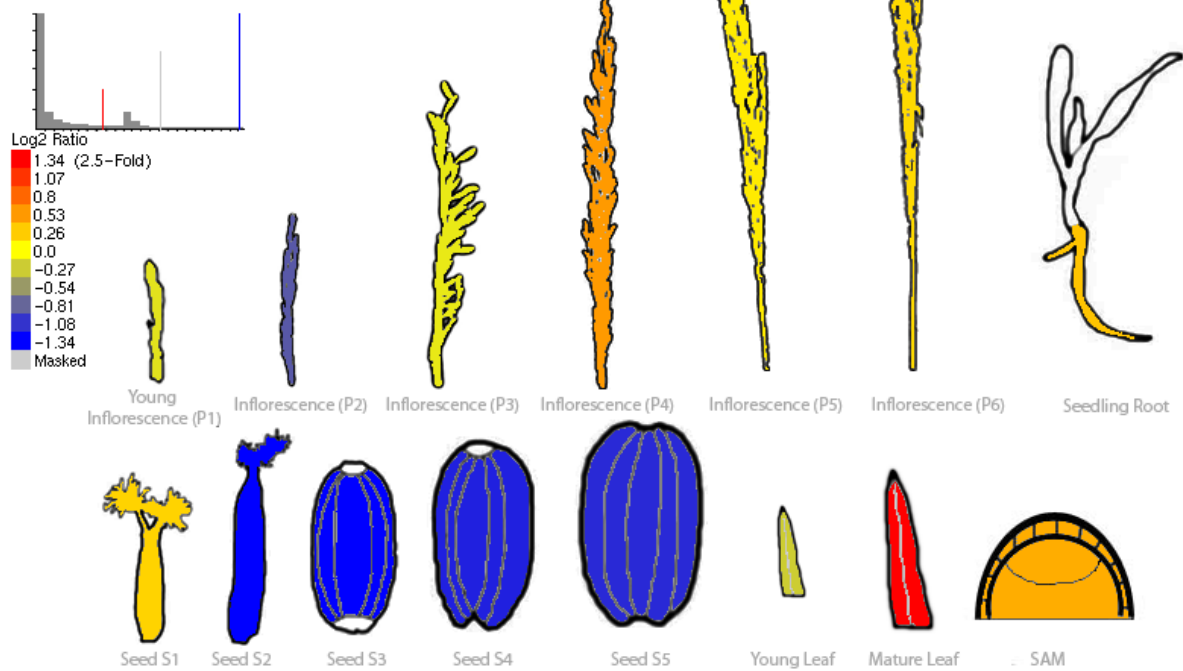


Figura S4. Expressão do gene *OsSIP2;1* (Os03g20410) em diferentes tecidos de arroz. Os dados foram obtidos do site BAR (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, <http://bar.utoronto.ca/>). A expressão foi normalizada pelo gene da *Ubiquitina-5* (*UBQ5*, LOC_Os03g13170).

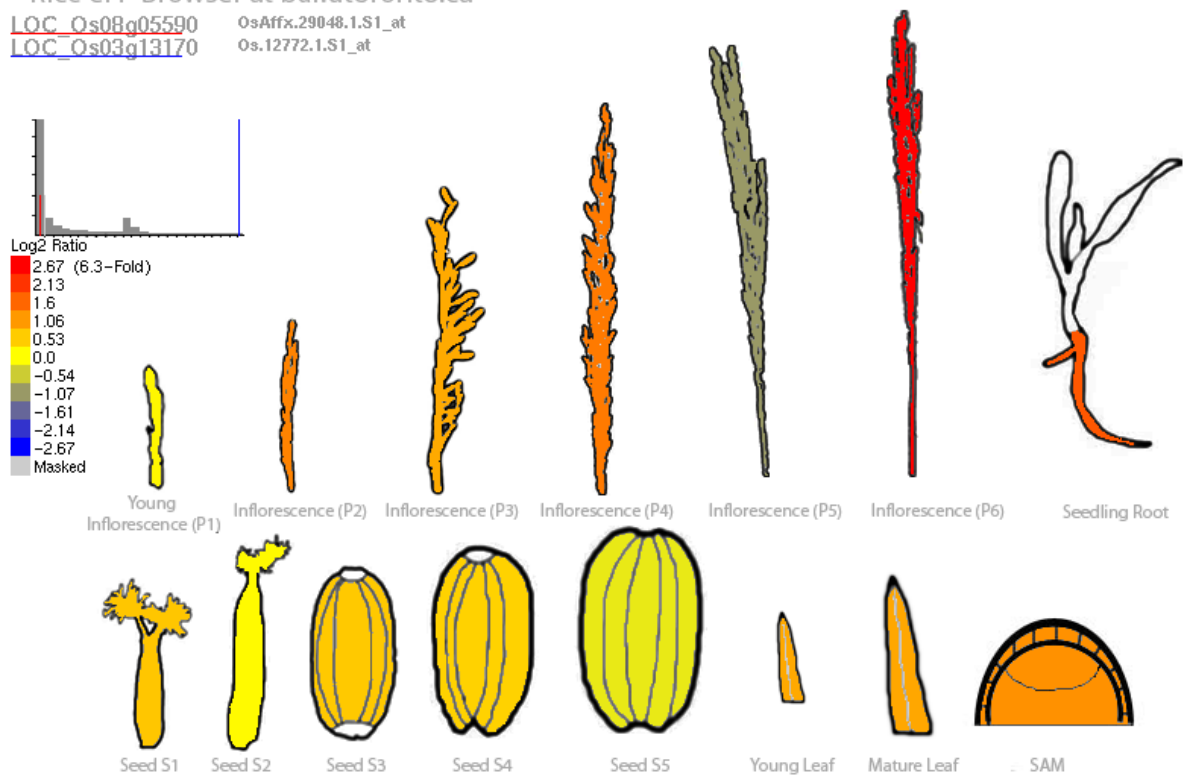


Figura S5. Expressão do gene *OsNIP3;2* (*Os08g05590*) em diferentes tecidos de arroz. Os dados foram obtidos do site BAR (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, <http://bar.utoronto.ca/>). A expressão foi normalizada pelo gene da *Ubiquitina-5* (*UBQ5*, *LOC_Os03g13170*).

CURRICULUM VITAE resumido

BUZINELLO, T. C.

1) DADOS PESSOAIS

Nome: Thyalla Copetti Buzinello

Local e data de nascimento: Barreiras, Bahia, 08/04/1988

Endereço profissional: Avenida Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43431, sala 214. Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS. CEP 91501-970

Telefone profissional: (55) 51 33089525 **E-mail:** thycb@hotmail.com.br

2) FORMAÇÃO

2009 – 2011 Pós-Graduação em Ciências Ambientais.

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Brasil

2005 – 2009 Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Brasil

3) EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

2011 – 2012 Professora de Biologia

Escola Estadual Onofre Pires

2012 – 2014 Professora de Ciências

Escola Estadual Madre Catarina Lépori