

Exploración de la regulación postranscripcional por miR-528 en la resistencia del arroz al virus de la hoja blanca

Johan Sebastián Ríos Zambrano^{1*}, Mauricio Alberto Quimbaya Gómez, PhD^{2,3}

¹ Programa de Biología, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia

² iOMICAS: Optimización Multiescala In-silico de Cultivos Agrícolas Sostenibles, Colombia

³ Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia

*Correspondencia:

e-mail: johan69@javerianacali.edu.co

Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son transcritos cortos no codificantes que guían el silenciamiento de genes en organismos eucariotas. En plantas, estas secuencias modulan procesos de desarrollo, diferenciación y señalización celular, además, juegan un papel importante en la respuesta a estreses abióticos y bióticos. El arroz (*Oryza sativa* L.), vital para la seguridad alimentaria global, destaca por su alta producción de compuestos bioactivos, vitaminas y minerales. Sin embargo, los daños causados por plagas y enfermedades son una de las restricciones más importantes en su producción. Se estima que sólo la infección por virus genera pérdidas globales en los cultivos de hasta el 1.5% anual y compromete hasta un 50% de su rendimiento productivo en el continente asiático.

La hoja blanca es una enfermedad que afecta significativamente a los países productores de arroz en América latina, su agente causal es el *Virus de la Hoja Blanca* (RHBV), cuyo vector (*Tagosodes orizicolus* Müir) facilita la rápida dispersión en los sistemas de cultivo. Aunque existen variedades con mayor tolerancia al RHBV, aún no se han dilucidado los mecanismos de resistencia al mismo. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo explorar la regulación postranscripcional ejercida por miR-528 en el genotipo Fedearroz-2000, sobre potenciales genes blanco para elucidar mecanismos puntuales asociados a la resistencia al virus de la hoja blanca en arroz. Los resultados de este ensayo evidencian como el gen precursor de miR-528 tiende a estar sobreexpresado en condiciones de infección por RHBV, sugiriendo su participación en los mecanismos de respuesta ante estreses bióticos y otros módulos de resistencia.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding transcripts that guide gene silencing in eukaryotic organisms. In plants, these sequences modulate developmental processes, differentiation and cell signaling, and play an important role in the response to abiotic and biotic stresses. Rice (*Oryza sativa* L.), vital for global food security, stands out for its high production of bioactive compounds, vitamins and minerals. However, damage caused by pests and diseases is one of the most important constraints on its production. It is estimated that virus infection alone generates global crop losses of up to 1.5% per year and compromises up to 50% of crop yields in Asia.

White leaf is a disease that significantly affects rice producing countries in Latin America. Its causal agent is the White Leaf Virus (RHBV), whose vector (*Tagosodes orizicolus* Müir)

facilitates rapid dispersal in cropping systems. Although there are varieties with greater tolerance to RHBV, the mechanisms of resistance to it have not yet been elucidated. The present research work aimed to explore the post-transcriptional regulation exerted by miR-528 in the Fedearroz-2000 genotype on potential target genes to elucidate specific mechanisms associated with resistance to rice white leaf virus. The results of this assay show that the miR-528 precursor gene tends to be overexpressed under RHBV infection conditions, suggesting its participation in response mechanisms to biotic stresses and other resistance modules.

Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) como cultivo económicamente relevante. Es uno de los cereales más utilizados para la alimentación humana desde su domesticación. Según estimaciones, su producción anual de 2,846 millones de toneladas debería doblarse para el 2050 (FAO. 2022), indicando así una fuerte presión debido al desarrollo económico y el crecimiento poblacional. Sin embargo, diversos tipos de estrés representan una serie de limitaciones que deberían ser superadas para garantizar la seguridad alimentaria global.

La producción de arroz encara numerosos estreses bióticos que directamente ponen en riesgo su crecimiento y desarrollo. El estrés biótico se caracteriza por su transmisión a través de entidades vivientes como insectos, hongos, bacterias y virus, por ejemplo, la *enfermedad de la hoja blanca* representa una de las mayores amenazas al cultivo y producción de arroz a nivel mundial, alcanzó notoriedad a mediados de 1935 cuando fue reportado en Colombia y dos décadas después se presentaron nuevos reportes en Panamá, Venezuela, Costa Rica y Cuba (Garces O., *et al.* 1958).

El agente causal de esta enfermedad es una entidad viral del género *Tenuivirus* llamado *Virus de la hoja blanca* (RHBV) que se transmite por el vector *Tagosodes orizicolus* Müir. La rápida dispersión de la enfermedad es atribuible a la capacidad de adaptación del vector a la zona tropical de América, la cual posee altas temperaturas y una elevada humedad relativa que proporcionan el entorno ideal para su desarrollo. Los síntomas de infección por RHBV se presentan desde la aparición de manchas blancas en la superficie foliar, hasta la marchitez completa de las plántulas en germinación. Se describe que el virus se transmite en los vectores de forma transovárica y finalmente pasa a las plantas por las glándulas salivales (Liu W y Wang X. 2018).

Los mecanismos de defensa prevalentes de las plantas ante el estrés biótico se pueden categorizar en tres capas como son: i. La inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), ii. La inmunidad desencadenada por efectores (ETI) y iii. El sistema de interferencia por ARN entre reinos mediado por exosomas (CKRI) (Zhang., *et al.* 2023). Según Hemmes H *et al* (2007), algunos *Tenuivirus* son capaces de evadir las primeras dos capas de inmunidad e incluso eludir los mecanismos de ribointerferencia de la capa CKRI, cuyo mecanismo hipotético se basa en la competencia selectiva de la proteína NS3 con algunos microRNAs endógenos del hospedero.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de defensa al estrés biótico causado por RHBV, en este trabajo se realizó la evaluación cuantitativa de la expresión del gen osa-miR-528, implicado en la capa regulatoria CKRI. Para ello, se evaluaron los niveles de expresión del gen en una variedad de arroz resistente al ataque. Los niveles de expresión capturados permitieron asociar la expresión del miR-528 con potenciales blancos genéticos involucrados en la respuesta al virus de la hoja blanca. Esta investigación aporta información para elucidar los mecanismos de resistencia a estreses bióticos, que, en un futuro, podrían ser implementados en las técnicas de mejoramiento vegetal.

Materiales y métodos

Selección de genes candidatos y diseño de primers

Por revisión de literatura, se buscó una lista de los patosistemas virales más comunes que afectan el arroz, en conjunto con los microRNAs y blancos asociados (Tabla S1). Luego se usó la base de datos miRBase ([/mirbase.org/](http://mirbase.org/)) para delimitar los locus y blancos más probables de los miRNAs seleccionados (Tabla S2). Con esta información, se seleccionó un par de miRNAs (osa-miR-528 y osa-miR-171b), presentes en patosistemas de arroz, pero no reportados como presentes en el ataque por virus de hoja blanca. De los miRNAs elegidos, se buscó por literatura algunos de sus potenciales blancos para posteriormente buscar las secuencias codificantes en repositorios como Rice Genome Annotation Project ([/rice.uga.edu/](http://rice.uga.edu/)) y EnsemblPlants ([/plants.ensembl.org/](http://plants.ensembl.org/)) (ver datos suplementarios). Posteriormente se seleccionaron los primers de los genes candidatos reportados en literatura, que luego fueron validados con el recurso OligoPerfect ([/www.thermofisher.com/co/](http://www.thermofisher.com/co/)), optando por aquellos primers que no formasen dímeros (Tabla S3).

Material vegetal y tratamiento experimental

La evaluación experimental se realizó con la variedad de arroz Fedearroz 2000, una variedad resistente al ataque por el virus de la hoja blanca (RHBV). El modelo experimental consistió en un grupo control (sin presencia del insecto vector ni del virus) y un grupo experimental o tratamiento el cual contenía el insecto vector infectado con el virus causante de la enfermedad. Después de 18 días luego de la germinación de las plántulas, se realizó la infestación disponiendo de dos insectos por planta, mientras que para el tratamiento control no hubo infestación. Luego de 3 días de exposición a los insectos, se realizó la desinfestación para retirar todos los vectores de las plantas tratadas. Al sexto día posterior a la remoción de los insectos, se hicieron *pooles* de seis plantas y se tomaron muestras de tejido vegetal (hojas) las cuales fueron depositadas en nitrógeno líquido. Cada *pool* corresponde a una réplica biológica. En el experimento se analizaron tres réplicas biológicas. Todos los ensayos fueron realizados en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Extracción ARN total y síntesis de ADNc

Se extrajo el ARN total de los *pooles* de plantas constituidos (3 réplicas biológicas para control y 3 réplicas biológicas para el tratamiento), usando el kit RNeasy Mini de Qiagen® procediendo con las instrucciones del proveedor. La cuantificación del ARN extraído se validó con el espectrofotómetro NanoPhotometer N120 de Implen™. Posteriormente, a partir de 1 µg de ARN se realizó la conversión a ADN complementario (ADNc) utilizando el kit Transcriptor Universal cDNA Master Mix de Roche® siguiendo las instrucciones del proveedor. El programa de síntesis de ADNc consistió en: anillamiento de primers (25 °C por 5 minutos), retrotranscripción (55 °C por 10 minutos), denaturación (85 °C por 5 minutos) y finalizó en 4 °C por tiempo constante para mantener la estabilidad de las muestras. Los datos de cuantificación están incluidos en la Tabla S4.

Análisis con PCR en tiempo real (qPCR) y análisis estadístico

Para la detección de los genes candidatos presentes en la variedad Fedearroz 2000, se evaluó cada réplica biológica con cuatro réplicas técnicas en un ensayo de PCR en tiempo real basado en detección por SYBR Green. Para cada reacción se utilizaron 3 µl de ADNc a una concentración de 2 ng/µl y 7 µl del Mix de amplificación (Power SYBR Green PCR Master Mix

(Roche®)) que contenía 1 µl de cada primer a una concentración final en la reacción de 2.5 µM. Las reacciones fueron incubadas en una microplaca de 384 pozos, usando el termociclador QuantStudio™ 6 Pro de Applied Biosystems. El programa de amplificación consistió en un periodo de incubación (95 °C por 600 segundos), 40 ciclos de amplificación (95 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos), seguido de un análisis de denaturación (Tm Calling) para corroborar la especificidad de los primers utilizados (Figura S1).

Se evaluaron los genes *osa-miR528-precursor* (AP014959.1), *OsGID1* (LOC_Os05g33730), *OsVIP2* (LOC_Os01g24880.2), *OsSCL6-IIa* (LOC_Os02g44370.1), cuya expresión se normalizó usando el gen constitutivo Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los primers utilizados están listados en la Tabla Suplementaria S3. Los análisis de expresión se determinaron con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ según Livak y Schmittgen T (2001). Finalmente, para determinar si existían diferencias estadísticas significativas se realizaron test estadísticos de *T-student* pareados y se definió un valor de significancia $p \leq 0.05$ entre control y tratamiento.

Resultados

Análisis del nivel de expresión génica, usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$

Para la variedad resistente *Oryza sativa* vr. Fedearroz 2000, la expresión del precursor de *osa-miR-528* presentó un aumento de 1.41 veces en respuesta a la infección por virus de la hoja blanca en relación al control (Figura 1a), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Por otro lado, el gen *OsGID1* presentó un descenso en la expresión relativa del 30% respecto al control (Figura 1b). Así mismo, la expresión relativa de los genes *OsVIP2* y *OsSCL6-IIa* no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento control (Figura 1c-d).

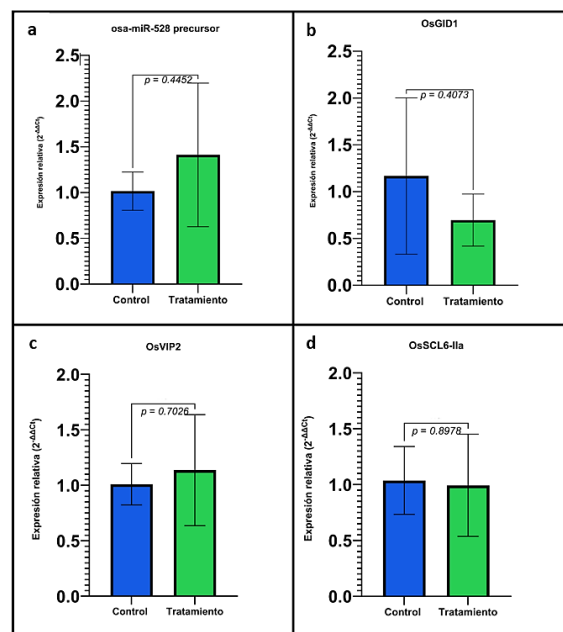


Figura 1. Nivel relativo de expresión para los genes a) *osa-miR528-precursor*, b) *OsGID1* c) *OsVIP2* y d) *OsSCL6-IIa* en la variedad de arroz *Oryza sativa* vr. Fedearroz 2000, usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

La comparativa entre los niveles de expresión relativa de los genes evaluados, demostró que únicamente el gen precursor *osa-miR-528* presentó una tendencia de sobreexpresión y por el contrario *OsGID1* tiende a estar subexpresado en condiciones de estrés biótico. Las tablas S5-

S8 muestran el promedio de los valores de expresión relativa de los genes evaluados para las muestras de *Oryza sativa* vr. Fedearroz 2000 usando GPDH como normalizador.

Discusión

En cuanto a las fuentes de resistencia al RHBV en arroz, un avance de Cruz-Gallego *et al* (2018) demostró que entre los 660 genotipos evaluados de arroz, siete de ellos son resistentes al RHBV, incluso diferenciándose de la variedad Fedearroz 2000 y Fedearroz 50 que usualmente son reportadas con mayor resistencia. Aunque no se han identificado genes candidatos de respuesta al estrés biótico causado por RHBV, un análisis de QTL (locus de rasgo cuantitativo) determinó que existe una región cromosómica (qHBV4.1) relacionada con una mayor probabilidad de respuesta inmune ante el RHBV (Romero L., *et al.* 2014).

Un análisis de Silva A *et al* (2022), corroboró que la región qHBV4.1 contiene 33 genes que codifican proteínas de función desconocida y un gen que codifica la proteína Argonauta 4 (AGO4). Este resultado sugiere que la principal acción de algunos genes de la región qHBV4.1 es la de actuar como efector en las primeras fases de interacción entre el virus y la planta e impedir la entrada del virus, ya que la proteína AGO-4 es uno de los componentes principales del complejo de silenciamiento por RNA, interactuando con secuencias únicas de genomas virales (Jones-Rhoades., *et al.* 2006).

Los resultados de este ensayo evidencian como el gen precursor de osa-miR-528 tiende a estar sobreexpresado en condiciones de infección por RHBV, soportado experimentalmente por lo demostrado por Wu J *et al* (2017), en donde este miRNA se transcribe activamente en el ataque del Virus de la Raya del Arroz (RSV). La tendencia de osa-miR-528 a aumentar su expresión, podría explicarse por la competencia que existe entre la unión de proteínas argonauta y la secuencia de osa-miR-528 (Kumar K., *et al.* 2022), activando a su vez la defensa contra el virus a nivel sistémico.

Por otro lado, el nivel de expresión relativa de OsGID1 se ve disminuido en el tratamiento de infección por RHBV, lo cual es soportado por los resultados de Du H *et al* (2015) que demuestran que OsGID1 al activarse transcripcionalmente induce la liberación de ácido abscísico y dispara las rutas de señalización mediadas por giberelinas durante la respuesta a estreses bióticos. Una posibilidad es que la expresión de miR-528, reduzca la expresión de OsGID1 y por lo tanto no se induzcan las vías de defensa mediadas por ácido abscísico y giberelinas, reduciendo la capacidad de la planta al ataque viral. Finalmente, las diferencias no significativas en la expresión de los demás genes evaluados, son explicadas principalmente, por la alta variación en las respuestas biológicas medidas, es necesario en próximas experimentaciones aumentar el número de réplicas biológicas a evaluar para encontrar un patrón más constante en la expresión de los genes evaluados.

Aunque no hubo diferencias significativas en la expresión relativa del gen OsSCL6-IIa entre los tratamientos y el control, un trabajo de Tong A *et al* (2017) soporta el rol múltiple que cumplen la familia de proteínas SCL6-IIa en procesos del desarrollo floral, la respuesta a estrés por metales pesados y la regulación de giberelinas ante ataques por RSV (Li Y., *et al.* 2022). Estos resultados de las pocas diferencias en la expresión génica, podrían deberse a la participación de OsSCL6-IIa en otros procesos celulares y que no controlan directamente el módulo de resistencia al RHBV.

Conclusiones

La tendencia en la expresión del gen precursor de osa-miR-528 fue mayor en los tratamientos de plantas infectadas con RHBV respecto al control, por su parte, el gen OsGID1 tiende a estar subexpresado en los tratamientos de plantas infectadas con RHBV. Esto sugiere que la exposición al virus de la hoja blanca tiende a incrementar la expresión de osa-miR-528 y a inhibir la expresión de OsGID1 en la variedad resistente Fedearroz 2000, sugiriendo la implicación del miR-528 en los mecanismos de respuesta ante la infección por el virus de la hoja blanca en arroz.

Referencias

- Baweja, P., & Kumar, G. (2020). Abiotic stress in plants: an overview. *Plant stress biology: Strategies and trends*, 1-15.
- Cruz-Gallego, M., Rebolledo, C., Cuasquer, J., Cruz, D., Peña-Fernández, A. L., Quintero, C., Silva-Córdoba, A., Álvarez M. F., Jojoa-Cruz, S., Lorieux, M., Stuart J. J & Correa, F. (2018). Identification of new sources of resistance to RHBV-rice hoja blanca virus. *Acta Agronómica*, 67(2), 368-374.
- Degiovanni Beltramo, V. M., Berrío Orozco, L. E., & Charry Mercado, R. E. (2010). Origen, taxonomía, anatomía y morfología de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.). *CGIAR*.
- Du, H., Chang, Y., Huang, F., & Xiong, L. (2015). GID1 modulates stomatal response and submergence tolerance involving abscisic acid and gibberellic acid signaling in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(11), 954-968.
- Garces-Orejuela, C., Jennings, P. R., & Skiles, R. L. (1958). Hoja blanca of rice and the history of the disease in Colombia. *Plant Disease Reporter*, 42(6), 750-751.
- Hemmes, H., Lakatos, L., Goldbach, R., Burguán, J., & Prins, M. (2007). The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *Rna*, 13(7), 1079-1089.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 19-53.
- Kumar, K., Mandal, S. N., Neelam, K., & de Los Reyes, B. G. (2022). MicroRNA-mediated host defense mechanisms against pathogens and herbivores in rice: balancing gains from genetic resistance with trade-offs to productivity potential. *BMC Plant Biology*, 22(1), 351.
- Li, Y., Tong, Y., He, X., Zhu, Y., Li, T., Lin, X., Mao, W., Gishkori, Z., Zhao, Z., Zhang J., Huang, Y., Pu, M., Fan, J., Wang J & Wang, W. (2022). The rice miR171b-SCL6-IIs module controls blast resistance, grain yield, and flowering. *The Crop Journal*, 10(1), 117-127.
- Liu, W., & Wang, X. (2018). New insights on the transmission mechanism of tenuiviruses by their vector insects. *Current opinion in virology*, 33, 13-17.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Nota informativa de la FAO sobre la oferta y la demanda de cereales | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (s.f.).WorldFoodSituation. <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>.

Romero, L. E., Lozano, I., Garavito, A., Carabali, S. J., Triana, M., Villareal, N., Reyes, L., Duque M. C., Martinez, C., Calvert, L & Lorieux, M. (2014). Major QTLs control resistance to rice hoja blanca virus and its vector *Tagosodes orizicolus*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(1), 133-142.

Silva, A., Montoya, M. E., Quintero, C., Cuasquer, J., Tohme, J., Graterol, E., Cruz, M., & Lorieux, M. (2023). Genetic bases of resistance to the rice hoja blanca disease deciphered by a quantitative trait locus approach. *G3 (Bethesda, Md.)*, 13(12).

Tong, A., Yuan, Q., Wang, S., Peng, J., Lu, Y., Zheng, H., Lin, L., Chen, H., Gong, Y., Chen, J., & Yan, F. (2017). Altered accumulation of osa-miR171b contributes to rice stripe virus infection by regulating disease symptoms. *Journal of experimental botany*, 68(15), 4357–4367.

Vaughan, D. A. (1994). The wild relatives of rice: a genetic resources handbook. *Int. Rice Res. Inst.*

Wu, J., Yang, R., Yang, Z., Yao, S., Zhao, S., Wang, Y., Li, P., Song, X., Jin, L., Zhou, T., Lan, Y., Xie, L., Zhou, X., Chu, C., Qi, Y., Cao, X., & Li, Y. (2017). ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice. *Nature plants*, 3, 16203.

Yang, R., Li, P., Mei, H., Wang, D., Sun, J., Yang, C., Hao, L., Cao, S., Chu, C., Hu, S., Song, X., & Cao, X. (2019). Fine-Tuning of MiR528 Accumulation Modulates Flowering Time in Rice. *Molecular plant*, 12(8), 1103–1113.

Yao, S., Yang, Z., Yang, R., Huang, Y., Guo, G., Kong, X., Lan, Y., Zhou, T., Wang, H., Wang, W., Cao, X., Wu, J., & Li, Y. (2019). Transcriptional Regulation of miR528 by OsSPL9 Orchestrates Antiviral Response in Rice. *Molecular plant*, 12(8), 1114–1122.

Zhang, R., Zheng, F., Wei, S., Zhang, S., Li, G., Cao, P., & Zhao, S. (2019). Evolution of disease defense genes and their regulators in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 335.

Zheng, L., Zhang, C., Shi, C., Yang, Z., Wang, Y., Zhou, T., Sun, F., Wang, H., Zhao, S., Qin, Q., Qiao, R., Ding, Z., Wei, C., Xie, L., Wu, J., & Li, Y. (2017). Rice stripe virus NS3 protein regulates primary miRNA processing through association with the miRNA biogenesis factor OsDRB1 and facilitates virus infection in rice. *PLoS pathogens*, 13(10), e1006662.