

EXPRESSÃO DO GENE *OSNR1* EM GENÓTIPOS DE ARROZ SUBMETIDOS A SALINIDADE NO INÍCIO DO ESTÁDIO VEGETATIVO

THAIS MONTEIRO MIRANDA¹; TAIS AMANDA MUNDT²; FERNANDA GOULART ACOSTA³; VIVIANE KOPP DA LUZ⁴; CAMILA PEGORARO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – thaismird@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – taismundt@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – f.goulartacosta@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – vivianekp2023@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado o produto de maior importância econômica em muitos países, constituindo o alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas. Por ser uma cultura que apresenta capacidade de se adaptar a diferentes condições, é cultivado e consumido em todos os continentes (EMBRAPA, 2021). A cultura do arroz enfrenta condições que nem sempre são favoráveis ao seu desenvolvimento e crescimento. Estresses abióticos como sal, frio, seca e metais tóxicos são algumas adversidades que a cultura pode enfrentar. Quase 20% das áreas cultivadas e metade das áreas irrigadas do mundo estão sob estresse salino (RAZZAQ et al. 2020). O estresse salino afeta a altura, o peso fresco, a massa seca total, o teor de pigmentos fotossintéticos e o teor de proteína das plantas (SHANG, 2022). Para contornar esse problema na cultura do arroz, é necessário uma compreensão completa da fisiologia, bioquímica, metabolismo e expressão gênica sob condições de estresse salino (LIU et al. 2022).

Pesquisas recentes descrevem o óxido nítrico (NO) como um importante componente na tolerância das plantas a vários estímulos ambientais, incluindo o estresse salino (SHANG, 2022; REDA, 2018). Diferentes estudos, incluindo o de YI et al. (2022) destacam a via da enzima nitrato redutase (NR) como principal produtor de NO em plantas. O estudo ainda indica que o nitrato promove o desenvolvimento e melhora a tolerância ao estresse salino, e que a produção de NO está associado à NR. Verificou-se que a expressão do gene *OsNR* possibilita o uso eficiente de nitrogênio em plantas de arroz. Por esse motivo, genes relacionados a síntese de óxido nítrico estão sendo cada vez mais estudados (YI et al. 2022).

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo analisar a expressão do gene *OsNR1* (*Os08g04681000*), envolvido na síntese de óxido nítrico, em genótipos de arroz contrastantes quanto a tolerância ao estresse por salinidade.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em ambiente controlado, no Centro de Genômica e Fitomelhoramento da Universidade Federal de Pelotas. Foi realizada a semeadura das cultivares BRS Pampeira (sensível a salinidade) e BRS Bojuru (tolerante a salinidade) em bandejas contendo solo proveniente de campo de cultivo de arroz. O manejo foi realizado conforme as recomendações técnicas de cultura de arroz irrigado, até o estágio vegetativo inicial V₄ (COUNCE et al. 2000). As plantas foram expostas a diferentes condições, no controle manteve-se a lâmina d'água, 25°C de temperatura e fotoperíodo de 16 horas durante 20 dias. Na condição de estresse salino, a lâmina de água foi mantida por 19 dias e após foi

realizada a drenagem e adição de solução salina (NaCl 120mM - ~ 12 dS.m⁻¹), mantendo a temperatura de 25°C e 16 horas de luz, por 24 horas.

Posteriormente foi realizada a coleta do tecido foliar dos tratamentos e, imediatamente congelado em nitrogênio líquido (N₂) e armazenado em ultrafreezer até o momento da extração de RNA. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com três replicatas biológicas, compostas por 50 plântulas cada.

Para a extração de RNA utilizou-se o tampão comercial *PureLink™ Plant RNA Reagent* (Invitrogen™) obedecendo as recomendações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro Nanovue e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose. Em seguida, 1µg de RNA passou pela digestão de DNA contaminantes utilizando a enzima DNase (Invitrogen™). O RNA foi convertido em cDNA com auxílio do kit comercial *SuperScrip III first-strand system for RT-PCR* (Invitrogen™).

Utilizou-se o banco de dados RAP-BD (*Rice Annotation Project Database* - <https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) para obtenção da região codificadora do gene *OsNR1* (*Os08g0468100*), envolvido na síntese de óxido nítrico em plantas. Desenhou-se os *primes* (F: *CTCATGACGCAGTACCTGGA* e R: *TTGCCGTTGATGACGAACT*), utilizando o programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007). Para análise de expressão via PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizou-se o manual MIQE (Bustin et al., 2009), e o equipamento *7500 Fast Real-time PCR System* (*Applied Biosystems*). Os genes 18S (*AK059783*), *OsACT1* (*Os03g0718100*), *OsEIF-4a* (*Os02g0146600*) e *OsUBC-E2* (*Os02g42314*), foram utilizados como normalizadores. A validação buscando determinar a eficiência de amplificação e a especificidade de cada primer foi realizada utilizando quatro diluições (1:5; 1:25; 1:125; 1:625) de um pool de cDNA.

Conduziu-se os ensaios de expressão gênica com o corante *SYBR Green mix*, com três replicatas técnicas de cada replicata biológica. A quantificação foi feita de acordo com o método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam níveis de expressão relativamente baixos no tecido foliar tanto na cultivar BRS Pampeira (sensível), quanto na cultivar BRS Bojuru (tolerante) conforme a Figura 1. Observou-se que o estresse salino ocasionou uma redução de expressão do gene *OsNR1* em ambas as cultivares. No entanto, estudos desenvolvidos por Yi et al. (2022) apontaram um aumento da expressão do gene *OsNR1* durante a germinação das sementes de arroz sob condição de estresse salino, associado a um maior acúmulo de NO. HUANG et al. (2020) e SHAMS et al. (2019), sugerem que o óxido nítrico (NO) pode desempenhar um papel benéfico no desenvolvimento de plantas sob condições de estresse salino, influenciando positivamente a absorção de nutrientes minerais. O gene *NiR1* desempenha um papel central na regulação da absorção de nitrogênio e na manutenção do equilíbrio do óxido nítrico (NO), tornando-se fundamental para governar o crescimento e o desempenho das plantas quando submetidas a condições de estresse (COSTA-BROSETA et al. 2020).

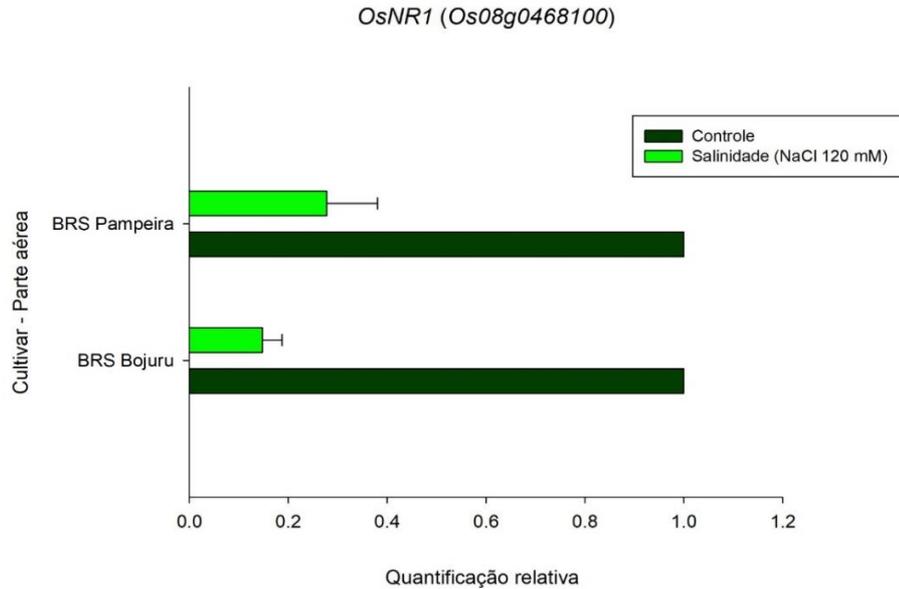


Figura 1- Quantificação relativa da expressão do gene *OsNR1* na parte aérea das cultivares de arroz BRS Bojuru e BRS Pampeira submetidas a 120mM de NaCl durante 24 horas.

A influência do óxido nítrico (NO) no crescimento e desenvolvimento das plantas está relacionada à concentração salina, à suscetibilidade das culturas e à constituição genética. Todos esses elementos exercem influência na habilidade das plantas em superar os impactos adversos causados pelo estresse salino (REN et al. 2020), e também explicam a resposta observada no presente estudo.

Existe a possibilidade que a expressão gênica de *OsNR1* não tenha sido pronunciada devido ao curto período de exposição ao estresse salino (24h). Por isso, sugere-se que seja necessário ampliar o tempo de exposição ao estresse para alcançar uma ativação completa do mecanismo de expressão desse gene.

4. CONCLUSÕES

Houve uma redução na expressão do gene *OsNR1* no tecido foliar de genótipos de arroz expostos a salinidade durante 24h no início do estágio vegetativo (V_4). Há indícios que devido as condições experimentais, tempo de exposição ao estresse e/ou concentração, o óxido nítrico não teve influência na tolerância das plantas ao estresse salino. Nesse contexto, torna-se necessário a realização de estudos mais aprofundados para confirmar a participação desse gene na tolerância ao estresse em arroz.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA-BROSETA, Á.; CASTILLO, M.; LEÓN, J. Nitrite Reductase 1 Is a Target of Nitric Oxide-Mediated Post-Translational Modifications and Controls Nitrogen Flux and Growth in Arabidopsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7270, 2020.

COUNCE, P. A; KEISLING T. C; MITCHELLA, A. J. Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing. **Rice Development. Crop Science**, v.40, p. 438–441, 2000.

EMBRAPA. **Cultivo do Arroz**. Embrapa Arroz e Feijão, 19 out. 2021. Especiais. Acessado em 02 set. 2023. Online. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologia/cultivos/arroz/producao/sistema-de-cultivo>

HUANG, J.; ZHU, C.; HUSSAIN, S.; HURANG, J.; LIANG, Q.; ZHU, L.; CAO, X.; KONG, Y.; LI, Y.; WANG, L. et al.; Effects of nitric oxide on nitrogen metabolism and the salt resistance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings with different salt tolerances. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 155, p. 374-383, 2020.

LIU, C.; MAO, B.; YUAN, D.; CHU, C.; DUAN, M. Salt tolerance in rice: Physiological responses and molecular mechanisms. **The Crop Journal**, v.10, n.1, p. 13-25, 2022.

RAZZAQ, A.; ALI, A.; SAFDRA, L. B.; ZAFAR, M. M.; RUI, Y.; SKAKEEL, A.; SHAUKAT, A.; ASHRAF, M.; GONG, W.; YUAN, Y. Salt stress induces physiochemical alterations in rice grain composition and quality. **Journal of Food Science**, v.85, n.1, p. 14-20, 2020.

REDA, M.; GOLICKA, A.; KABATA, K.; JANICKA, M. Involvement of NR and PM-NR in NO biosynthesis in cucumber plants subjected to salt stress. **Plant Science**, v. 267, p. 55–64 2018.

REN, Y.; WANG, W.; HE, J.; ZANG, L.; WEI, Y.; YANG, M. Nitric oxide alleviates salt stress in seed germination and early seedling growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.) by enhancing physiological and biochemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 187, 2020.

SHAMS, M.; EKINCI, M.; ORS, S.; TURAN, M.; AGAR, G.; KULL, R.; YILDIRIM, E. Nitric oxide mitigates salt stress effects of pepper seedlings by altering nutrient uptake, enzyme activity and osmolyte accumulation. **Physiology and Molecular Biology Plants**, v. 25, p. 1149-1161, 2019.

SHANG, J.; LI, X.; LI, C.; ZHAO, L. The Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Salt Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 2-19, 2022.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 71–74, 2007.

YI, Y.; PENG, Y.; SONG, T.; LU, S.; TENG, Z.; ZHENG, Q.; ZHAO, F.; MENG, S.; LIU, B.; PENHG, Y.; CHEN, G.; ZHANG, J.; YE, N. NLP2-NR Module Associated NO is Involved in Regulating Seed Germination in Rice under Salt Stress. **Plants**, v. 11, n. 6, p. 2-17, 2022.