

## AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO DEGRANE EM ARROZ ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL

NUNES, A.L.<sup>1,2</sup>; MEROTTO JR., A.<sup>1</sup>; DELATORRE, C.A.<sup>1</sup>; VIDAL, R.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); (51) 3308-6013; cadtorre@ufrgs.br; merotto@ufrgs.br, ribas.vidal@ufrgs.br.

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação Tecnológica do Rio Grande do Sul (IFRS); (54) 3445-8015; anderson.nunes@sertao.ifrs.edu.br

### Resumo

O degrane é uma característica evolutiva e adaptativa para a dispersão e distribuição de sementes em espécies daninhas. Trabalhos iniciais de fenotipagem verificaram existir grande variabilidade fenotípica do degrane. Além disso, foram encontradas associações entre esta variabilidade fenotípica e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *SH1* e *SH4*. Dependendo da alteração na cadeia de aminoácidos causado pelos SNPs os ecótipos podem apresentar maior ou menor nível de degrane. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a técnica de PCR em tempo real para estudos relacionados ao degrane de arroz e relacionar o nível de expressão dos genes *SH1* e *SH4* com o nível de degrane das sementes. O isolamento do RNA foi realizado dez dias após a polinização a partir de 30 junções pedicelo/flor que foram polinizadas na mesma hora e dia. A resistência à tensão de ruptura dos ecótipos de arroz vermelho AV 60 e AV 31 foi de 26 e 53 gf, respectivamente. Já para as cultivares Lacassine e Batatais a resistência à tensão de ruptura foi de 102 e 159 gf, respectivamente. Tanto para o gene *SH1* quanto para *SH4* não houve diferenças na expressão entre os ecótipos de arroz vermelho. Entretanto, na cultivar Lacassine houve uma maior expressão destes genes em relação aos ecótipos de arroz vermelho e menor em relação a Batatais. A expressão dos genes *SH1* e *SH4* mostrou ter uma relação direta e positiva com a ausência de degrane. O aumento em uma vez no nível de expressão dos genes *SH1* e *SH4* corresponde em um aumento na resistência à tensão de ruptura de 59 e 48 gf, respectivamente. A técnica de PCR em tempo real foi adequada para de avaliação da expressão dos genes relacionados a debulha.

**Palavras-Chave:** degrane, PCR em tempo real, *SH1*, *SH4*.

### Abstract

The seed shattering is an evolutionary and adaptive trait to dispersion and distribution of seeds of weed and wild rice. Preliminary studies of phenotyping show that there are great variability in the seed shattering. In addition, were found associations between this variability and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes *SH1* and *SH4*. Depending on the change in the chain of amino acids caused by SNPs the ecotypes may have greater or lesser degree of seed shattering. The aims of this study were evaluate the PCR real time technique to study the shattering in rice and to relate the level of gene expression *SH1* and *SH4* with the level of seed shattering. The extraction of RNA was performed ten days after pollination from 30 flower and pedicel junction that were pollinated at the same time and day. The tensile strength at break of the red rice ecotypes AV 60 and AV 31 was 26 and 53 gf, respectively. Already, in the rice cultivars Lacassine and Batatais the tensile strength at break was 102 and 159 gf, respectively. The expression of the genes *SH1* and *SH4* was similar between the two red rice ecotypes. However, the expression of these genes was a greater in the cultivar Lacassine in comparison with the red rice ecotypes and smaller than the Batatais cultivar. The gene expression of *SH1* and *SH4* showed a direct relationship with the lack of seed shattering. The one folder increasing of expression of the genes *SH1* e *SH4* was related with the increasing of the tensile strength at break of 59 e 48 gf, respectively.

**Key Words:** shattering, real time PCR, *SH1*, *SH4*.

### Introdução

O degrane ou debulha natural é uma característica evolutiva e adaptativa para a dispersão e distribuição de sementes em espécies daninhas e silvestres do arroz (Lin et al., 2007). No arroz vermelho a ausência de degrane seria desvantajosa para as plantas que crescem associadas às plantas cultivadas (Gu et al., 2005). Com a ausência de debulha natural, a maioria das sementes produzidas pelas espécies daninhas seriam colhidas e retiradas do local de infestação, diminuindo continuamente suas populações. Com isso, haveria a tendência do desaparecimento das espécies daninhas, uma vez que o acréscimo no banco de sementes ocorre, principalmente, através do degrane das sementes das plantas estabelecidas no local durante o ciclo da cultura anterior (Avila et al., 2000). Normalmente a zona de abscisão entre o grão do arroz e o pedicelo é formada por uma camada de pequenas células com a parede celular fina. Nas plantas que apresentam degrane esta camada de células é contínua em toda a zona de abscisão (Li et al., 2006a). O processo de abscisão é gerado pela produção de etileno, que inibe a produção de auxina. Respondendo a certos sinais, enzimas hidrolíticas, como polygalacturonase e  $\beta$ -endo-glucanase, são ativadas nas células da camada de abscisão, causando a degradação da lamela média e da parede celular resultando na queda do grão (Roberts et al. 2002).

A debulha natural no arroz é controlada por múltiplos genes ou QTLs. Análises genéticas de uma população  $F_2$  proveniente do cruzamento entre *Oryza sativa* ssp. *indica* e *O. nivara* (espécie silvestre e anual) identificaram três QTLs (*sh3*, *sh4* e *sh8*) responsáveis pela redução da debulha natural de grãos no arroz cultivado (Li et al., 2006b). Neste estudo, verificou-se que o QTL *SH4* localizado no cromossomo 4 é dominante e explica 69% da variância fenotípica. Entretanto, analisando geneticamente uma população  $F_2$  oriunda do cruzamento entre *O. sativa* ssp. *indica* e *O. sativa* ssp. *japonica* detectou-se cinco QTLs, sendo que, o alelo *SH1* presente no cromossomo 1 explica 69% da variância fenotípica (Konishi et al., 2006).

Trabalhos iniciais de fenotipagem verificaram existir grande variabilidade fenotípica do degrane em relação a vários acessos de arroz vermelho, arroz cultivado e outras espécies silvestres do gênero *Oryza* (Nunes et al., 2009). Além disso, foram encontradas associações entre esta variabilidade fenotípica e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). O SNP encontrado no gene *SH4* parece não estar relacionado com o degrane, mas no gene *SH1* foram encontrados dois SNPs, onde os ecótipos que não possuem estes polimorfismos apresentam elevado nível de degrane, os ecótipos que possuem o SNP que confere troca do aminoácido metionina para treonina apresentam degrane intermediário e os ecótipos que possuem o SNP que confere troca do aminoácido cisteína para alanina apresentaram baixo nível de degrane (Nunes et al., 2009). O próximo passo para o melhor entendimento da relação entre os genes *SH1* e *SH4* e o degrane é verificar a expressão destes genes em materiais contrastantes.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a técnica de PCR em tempo real para estudos relacionados ao degrane de arroz, e relacionar o nível de expressão dos genes *SH1* e *SH4* com o nível de degrane das sementes.

## Material e Métodos

Os materiais vegetais analisados foram os ecótipos de arroz vermelho AV 31 e AV 60 e os cultivares de arroz Batatais e Lacassine. As plantas foram semeadas em tanques de concreto contendo solo hidromórfico classificado como gleissolo. O degrane foi determinado através da medição da resistência à tensão de ruptura (gf), onde o grão era envolvido com um arame em forma de gancho e pesos de 10 gramas foram adicionados no gancho até haver a separação do grão da planta mãe. Quanto maior a resistência à tensão de ruptura menor é o nível de degrane.

O isolamento do RNA total (ácido ribonucléico) foi realizado dez dias após a polinização a partir de 30 junções pedicelo/flor sendo que, a parte do pedicelo tinha 1mm e a parte da flor 1,5 mm. Foram selecionadas panículas polinizadas na mesma hora e dia. A extração do RNA foi realizada com o reagente TRIZOL<sup>®</sup>. O RNA extraído foi tratado com DNase e liofilizado. O produto da liofilização foi resuspenso em água na concentração de  $1\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ . Após, foi realizada a transcrição reversa com o kit “SuperScript<sup>™</sup>III” utilizando iniciadores polidT para que fossem formados fragmentos. As amostras de cDNA foram diluídas na proporção de 1:100 (cDNA: água destilada) e então conduzidas as amplificações.

Para a realização da amplificação pela PCR em tempo real foi utilizado o equipamento “7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em placas contendo 96 poços “PCR-96M2 – HS – C Axygen<sup>®</sup>” com selador “MicroAmp<sup>™</sup> Optical Adhesive Film Applied Biosystems<sup>®</sup>”. A avaliação da expressão do gene *SH1* foi avaliada através dos iniciadores 5' ATGGCTCAGCTTCCTTCAGA 3' e

5' TTCAGGGACCTCCATTTTCAG 3'. A expressão do gene *SH4* foi avaliada com os iniciadores 5' GGAACGGAGGGAGAAGTAGA 3' e 5' CCTGTCCATGGTAAAGTGTGG 3'. Cada amostra de cDNA foi avaliada em triplicata e controle negativo. O gene constitutivo utilizado para atuar como controle endógeno na análise de expressão através de PCR em tempo real foi o 28S rRNA, (5' CTGATCTTCTGTGAAGGGT 3' e 5' TGATAGAACTCGTAATGGGC 3').

Todas as reações foram realizadas em volume final de 10 µl contendo 5 µl da reação composta de 1 µL tampão 10X, 0,06 µL dNTPs (10 µM cada nucleotídeo), 0,6 µL de solução de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µL de "SYBR Green" diluído 1:100 (preparado na hora da utilização a partir de solução diluída 100X), 0,2 µL de "ROX Reference Dye", 0,025 µL Taq Platinum Invitrogen e 0,2 µL da combinação de iniciadores *forward* e *reverse* e 5µl da amostra de cDNA (diluída 1:100) e água destilada para completar 10 µL.

As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de aquecimento de 50°C por 2 minutos, seguido por um ciclo inicial de 95°C de 10 minutos após seqüência de 40 ciclos: iniciado com 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, nesta etapa foi capturada a fluorescência, para finalizar foi adicionado um ciclo final de dissociação. Terminada a reação, analisou-se a curva de dissociação para proporcionar a avaliação da pureza do produto formado e confirmar a ausência de dímeros de iniciadores ou produtos inespecíficos.

A amplificação realizada pela PCR em tempo real foi analisada pela quantificação relativa, a qual determina o número de cópias de um gene alvo em relação a um controle endógeno, no caso 28S rRNA. O cálculo baseia-se, indiretamente, na separação dos Cts (*cycle threshold*), que correspondem aos ciclos de PCR nos quais o sinal de amplificação atinge um valor exponencial. Quanto maior for a quantidade inicial de cDNA, mais cedo o produto acumulado é detectado no PCR e menor será o valor de Ct. Posteriormente, calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada dado.

O *threshold* foi ajustado manualmente, procurando-se uma posição satisfatória para todas as amostras, sempre na fase logarítmica. Para análise dos dados foram colhidos valores de Ct (*cycle threshold*) e realizadas médias das amostras em triplicatas com desvio padrão inferior a 0,5 de indivíduos calibradores e indivíduos alvo para cada gene. Utilizou-se a fórmula de Dussault & Pouliot (2006), onde o  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{28S}) - (Ct_{calibrador} - Ct_{28S})$  é a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  fornece a dimensão de variação.

## Resultados e Discussão

No dia da coleta e extração do RNA das junções entre o pedicelo e flor, foi verificado que não houve diferença no degrane entre os quatros grupos de planta analisados (AV 31, AV60, Lacassine e Batatais) e a média da resistência à tensão de ruptura dos materiais foi de 215 gf (dados não apresentados). Ao final do ciclo, no momento da maturação fisiológica das sementes foi verificada diferenças no nível de degrane entre os ecótipos (Figura 1). A média da resistência à tensão de ruptura dos materiais no momento da maturação foi de 85 gf. Estes resultados mostram, de uma maneira geral, que da polinização até a maturação fisiológica há redução da resistência à tensão de ruptura (aumento do degrane). Não houve diferença na resistência à tensão de ruptura entre os ecótipos de arroz vermelho, AV 60 e AV 31, e a média da resistência à tensão de ruptura destes ecótipos foi de 26 e 53 gf, respectivamente. As cultivares Lacassine e Batatais apresentaram resistência à tensão de ruptura diferentes entre si e entre os ecótipos AV 60 e AV 31. A média da resistência à tensão de ruptura da cultivar Lacassine e Batatais foi de 102 e 159 gf, respectivamente (Figura 1).

Os iniciadores desenhados para o gene *SH1* e *SH4* proporcionaram adequada amplificaram nas condições em que a reação foi realizada. Nas análises da expressão relativa realizadas por PCR em tempo real, tanto para a expressão do gene *SH1* quanto para o *SH4* o ecótipo de arroz vermelho AV 60 foi considerado como amostra calibradora. Neste tipo de determinação a amostra calibradora deve ser aquela que apresenta comportamento padrão. Como o degrane é uma característica presente nos ancestrais do arroz e a ausência de degrane está presente somente em cultivares domesticadas o ecótipo que apresentou maior nível de degrane foi selecionado como amostra calibradora.

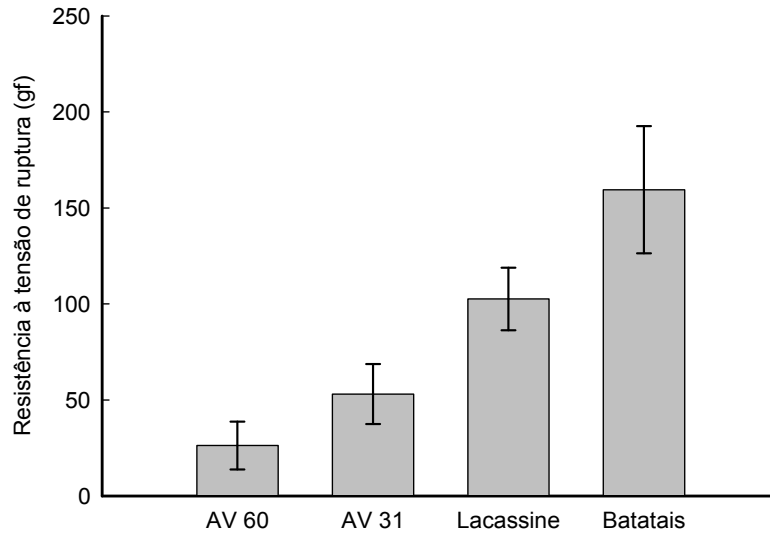


Figura 1. Resistência à tensão de ruptura do grão no pecíolo no momento da maturação.

Para o gene *SH1* não houve diferença entre do nível de expressão entre os ecótipos de arroz vermelho AV 60 e AV 31 (Figura 2). Já o cultivar Lacassine expressou duas vezes mais o gene *SH1* em relação ao AV 60 e o cultivar Batatais expressou quase 3,5 vezes mais este gene em relação a amostra calibradora (Figura 2). Esses resultados indicam uma relação direta entre o nível de expressão do gene *SH1* com o nível de degrane. Através de regressão linear é verificado que o aumento de uma vez no nível de expressão corresponde a um aumento de 59 gf na resistência a tensão de ruptura ( $R^2$  0,977) (dados não apresentados).

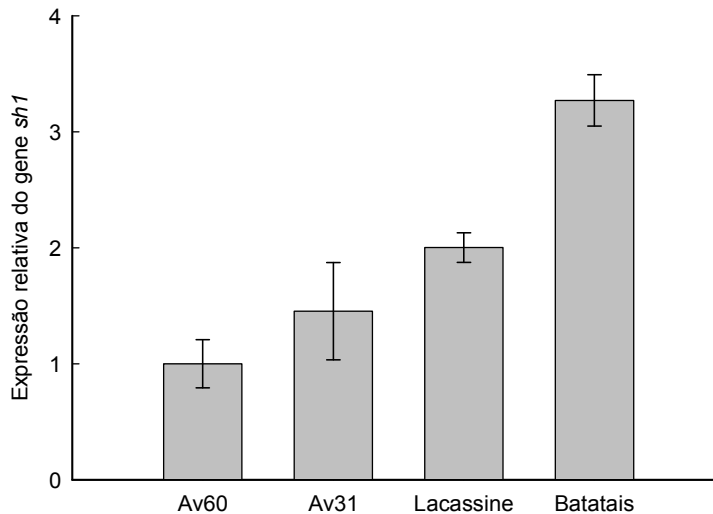


Figura 2. Expressão relativa do gene *SH1* na junção entre o pedicelo e a flor, dez dias após a polinização.

A expressão do gene *SH4* apresentou o mesmo padrão de expressão do gene *SH1*. Não houve diferenças na expressão do gene *SH4* entre os ecótipos de arroz vermelho (Figura 3). As cultivares Lacassine e Batatais expressaram 2,23 e 3,60 vezes mais este gene em relação a amostra calibradora (AV 60). Assim como para o gene *SH1*, os resultados de expressão relativa do gene *SH4* indicam uma relação direta entre o nível de expressão deste gene com o nível de degrane. Através de regressão linear é verificado que o aumento de uma vez no nível de expressão do gene *SH4* corresponde a um aumento de 48 gf na resistência a tensão de ruptura ( $R^2$  0,978) (dados não apresentados).

Os genes *SH1* e *SH4* codificam fatores de transcrição do tipo *BEL1 homeobox* e *Myb3*, respectivamente (Konishi et al., 2006; Li et al., 2006a). Estes fatores de transcrição são proteínas

necessárias para que a RNA polimerase consiga encontrar o ponto de início da transcrição e codifique uma outra proteína. Isso explica porque no momento da coleta do RNA não havia diferenças no nível de degrane entre os ecótipos, apesar de haver uma diferença no nível de expressão de *SH1* e *SH4*, pois provavelmente esta outra proteína é que possui ação propriamente dita sobre o nível de degrane.

A técnica de PCR em tempo real foi adequado para de avaliação da expressão dos genes relacionados a debulha. Desta forma, estudos de diferentes genótipos de arroz vermelho ou cultivado podem ser realizados com maior nível de detalhamento, buscando maiores conhecimentos da variabilidade genotípica existente para esta característica e também do efeito de variações ambientais sobre a magnitude da debulha. Com melhor compreensão deste caractere será possível determinar práticas de manejo que permitam reduzir os problemas da principal planta daninha do sistema orizícola do Brasil.

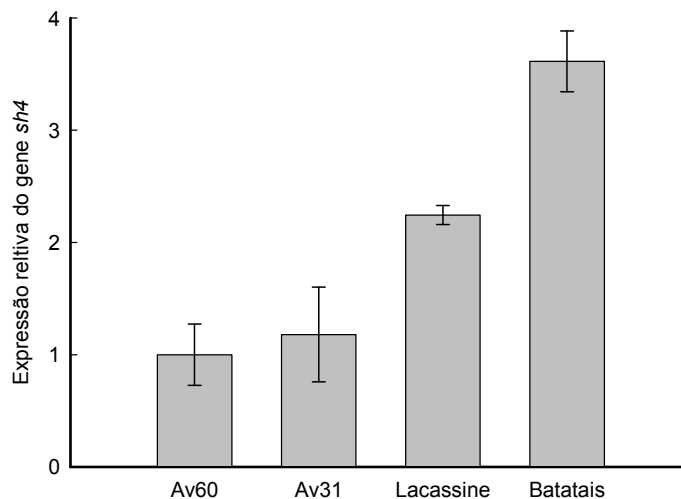


Figura 3. Expressão relativa do gene *SH4* na junção entre o pedicelo e a flor, dez dias após a polinização.

#### Literatura Citada

AVILA, L.A.D.; ANDRES, A.; MARCHEZAN, E.; MENEZES, V.G. Banco de sementes de arroz vermelho em sistemas de semeadura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, v.30, p.773-777, 2000.

DUSSAULT, A.A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, v.8, p.1-10, 2006.

GU, X.Y.; KIANIAN, S.F.; HARELAND, G.A.; HOFFER, B.L.; FOLEY, M.E. Genetic analysis of adaptive syndromes interrelated with seed dormancy in weedy rice (*Oryza sativa*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.1108-1118, 2005.

KONISHI, S.; IZAWA, T.; LIN, S.Y.; EBANA, K.; FUKUTA, Y.; SASAKI, T.; YANO, M. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. **Science**, v.312, p.1392-1396, 2006.

LI, C.B.; ZHOU, A.L.; SANG, T. Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. **New Phytologist**, v.170, p.185-193, 2006b.

LI, C.B.; ZHOU, A.L.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, v.311, p.1936-1939, 2006a.

LIN, Z.W.; GRIFFITH, M.E.; LI, X.R.; ZHU, Z.F.; TAN, L.B.; FU, Y.C.; ZHANG, W.X.; WANG, X.K.; XIE, D.X.; SUN, C.Q. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v.226, p.11-20, 2007.

ROBERTS, J.A.; ELLIOTT, K.A.; GONZALEZ-CARRANZA, Z.H. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.131-158, 2002.