

AVANÇOS NA ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO MOLECULAR DO DEGRANE EM ARROZ VERMELHO

MARKUS, C. (UFRGS, Porto Alegre/RS – catarine.markus@gmail.com), NUNES, A. N. (IFRS, Sertão/RS – nunes.ander@gmail.com), MENEGUZZI, C. (UFRGS, Porto Alegre/RS – catimeneguzzi7@hotmail.com), BARCELOS, J. A. N. (UFRGS, Porto Alegre/RS – joseari.barcelos@gmail.com), DELATORRE, C. A. (UFRGS, Porto Alegre/RS – cadtorre@ufrgs.br), MEROTTO JR, A. (UFRGS, Porto Alegre/RS – aldo.merotto@ufrgs.br).

RESUMO: O degrane é uma das principais características que torna o arroz vermelho daninho. A melhor compreensão da regulação do degrane poderá ser utilizada para desenvolver procedimentos moleculares que possam contribuir para a mitigação do arroz vermelho. O objetivo deste trabalho foi determinar a regulação do degrane em arroz vermelho a partir dos conhecimentos sobre a variabilidade de genes originalmente identificados em arroz cultivado e envolvidos na biossíntese da parede celular ainda não relacionados com o degrane. O gene *qSH1* comumente relacionado com o degrane não possui efeito nos genótipos de arroz vermelho avaliados. Os resultados do sequenciamento do gene *Sh4* mostraram ausência da mutação G₂₃₇T. A variabilidade nucleotídica do gene *Os08g0512400* a 1271 bases upstream mostrou que os genótipos com o nucleotídeo T possuem em geral elevado degrane, enquanto que os genótipos com o nucleotídeo A apresentam baixo degrane. Além disso, a variação nucleotídica do exon 5 do gene *Os01g0849100* apresentou dois SNPs, que podem estar relacionados ao degrane. A expressão relativa dos genes *OsXTH8* e *OsCel9D* apresentaram relação direta e inversa, respectivamente, com o degrane em arroz vermelho. Os resultados encontrados demonstram que o degrane de sementes em arroz vermelho é regulado por vários genes, diferentemente dos resultados obtidos em arroz cultivado, onde um gene de grande efeito é responsável por 69 % da regulação desse caráter. A utilização dos principais genes relacionados ao degrane de sementes caracterizados em arroz cultivado *qSH1*, *Sh4* e *OsCPL1* para o desenvolvimento de tecnologias de silenciamento gênico relacionadas a diminuição do degrane não serão eficientes em relação ao arroz vermelho existente no Sul do Brasil, e que os genes *OsXTH8*, *OsCel9D*, *Os01g0849100* e *Os08g0512400* devem ser considerados nestes procedimentos.

Palavras-chaves: *Oryza sativa*, arroz daninho, degrane das sementes, expressão gênica.

INTRODUÇÃO

O elevado degrane é fundamental para perpetuação do arroz vermelho (*Oryza sativa*), pois na ausência deste caráter as sementes poderiam ser colhidas e retiradas da

lavouira juntamente com as sementes de arroz cultivado. A suscetibilidade ao deigrane é resultante da presença de uma camada de abscisão formada por pequenas células com parede celular fina entre o grão de arroz e o pedicelo (Li et al., 2006).

Estudos moleculares sugerem que grande número de genes está envolvido no controle genético do deigrane em arroz cultivado, relacionados, principalmente, à diferenciação das células da camada de abscisão (Huang et al., 2010). No entanto, poucos genes com grande efeito sobre o deigrane foram identificados e clonados em arroz cultivado. Dentre eles, estão os genes *Sh4*, *qSH1* e *sh-h* ou *OsCPL1* (Li et al., 2006; Ji et al., 2010). A compreensão do deigrane é ainda menor em arroz vermelho, sendo que o entendimento da regulação desse caráter pode ser utilizado para o desenvolvimento de procedimentos de biotecnologia que permitam reduzir os problemas desta planta daninha. O objetivo deste trabalho foi determinar a regulação do deigrane em arroz vermelho a partir dos conhecimentos sobre a variabilidade de genes originalmente identificados em arroz cultivado e envolvidos na biossíntese da parede celular ainda não relacionados com o deigrane.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações de arroz cultivado e arroz vermelho anteriormente fenotipadas quanto ao nível de deigrane foram analisadas quanto à variabilidade nucleotídica e expressão gênica de genes relacionados a esta característica. Foi avaliada a variabilidade nucleotídica dos genes *qSH1*, *Sh4*, *OsCPL1*, *OsXTH8*, *Os02g0613200*, *Os03g0745400*, *Os05g0117300*, *Os08g0512400*, *Os10g0137700*, *Os11g0148700* e *Os01g0849100*. O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de folhas jovens de plantas individuais através do protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) modificado. A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em termociclador PTC100[®] (MJ Research) e consistiu de 20 ng de DNA genômico. As amostras amplificadas foram purificadas através de clorofórmio: álcool isoamílico e enviadas ao sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer[®]. As sequências obtidas dos genes foram editadas pelo programa BioEdit (versão 7.0.5.3). Após, estas sequências foram alinhadas através do programa ClustalW (versão 1.82). O alinhamento foi realizado através das ferramentas BLASTn e BLASTx, com base nas sequências dos genes previamente depositadas em banco de dados, como *GenBank* e *Gramene*.

A análise da expressão dos genes *Sh4*, *OsXTH8* e *OsCel9D* foi realizada através de RT-PCR em tempo real. Perfilhos com panículas polinizadas naturalmente no mesmo dia e hora foram coletadas no mesmo momento aos dez dias após a polinização. Após, foram coletadas 30 junções pedicelo-flor do terço médio da panícula (30 mg de material vegetal)

por repetição, a qual consistiu de aproximadamente 1 mm da região do pedicelo e de 1,5 mm da região da flor. Cada ecótipo ou cultivar contou com três repetições biológicas e cada repetição biológica contou com quatro replicatas. A extração do RNA foi realizada pelo método Trizol[®]. A análise da reação de RT-PCR em tempo real foi iniciada pela interpretação da curva de dissociação para verificar a pureza do produto formado e confirmar a ausência de dímeros de iniciadores ou produtos inespecíficos. Os níveis de expressão relativa foram realizados através da fórmula onde o $\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{28S}) - (Ct_{calibrador} - Ct_{28S})$, sendo o $\Delta\Delta Ct$ a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ fornece a dimensão de variação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento da região regulatória 5' do gene *qSH1*, a 11841 bases upstream em 36 genótipos de arroz, mostrou, com exceção da cultivar Nipponbare, que a base presente era G (dados não apresentados). Os resultados do sequenciamento do gene *Sh4* mostraram ausência da mutação G₂₃₇T (dados não apresentados). Para o gene *OsCPL1* não foram encontrados SNPs no exon 6 e na região entre o intron 7 e exon conforme literatura (Ji et al., 2010) em 32 genótipos avaliados (dados não apresentados). Os resultados obtidos no sequenciamento dos genes *qSH1*, *Sh4* e *OsCPL1*, divergentes daqueles apresentados na literatura, mostram que o controle do degrane pode ser realizado por diferentes genes, dependendo da origem do genótipo. Além disso, não foram encontrados SNPs relatados por Huang et al (2010) nos genes *Os02g0613200*, *Os03g0745400* e *Os11g0148700* em nenhum dos 32 genótipos analisados. Para os genes *OsXTH8*, *Os05g0117300* e *Os10g0137700* foram encontradas alterações em somente alguns dos genótipos analisados (dados não apresentados), de forma não relacionada com o degrane.

A variação nucleotídica do exon 5 do gene *Os01g0849100* apresentou dois SNPs, nas posições 2981 e 3057, que podem estar relacionados ao degrane em arroz (Figura 1A). De uma forma geral, os genótipos que possuem nas posições 2981 e 3057 os nucleotídeos G e T, respectivamente, possuem elevado degrane. Os genótipos que possuem médio degrane possuem os nucleotídeos A e T nas posições citadas. Por fim, os genótipos que possuem o nucleotídeo G nas posições 2981 e 3057, tendem a possuir menor degrane (Figura 1A). O alinhamento parcial das sequências a 1271 bases upstream do gene *Os08g0512400* em 28 genótipos de arroz (Figura 1B) mostrou resultados que podem apresentar relação entre a presença de SNPs e a mudança no fenótipo. Na região regulatória 5' do gene *Os08g0512400* os genótipos que apresentam o nucleotídeo T na posição 1271 upstream do gene tendem a apresentar elevado degrane, enquanto que os genótipos que apresentam o nucleotídeo A tendem a apresentar baixo degrane (Figura 1B).

O gene *Sh4* apresentou expressão na região entre o pedicelo e a flor, aos dez dias após a polinização. Entretanto, sua expressão relativa não mostrou relação direta com nível de degrane, pois fenótipos contrastantes apresentaram nível de expressão semelhante (dados não apresentados). A análise da expressão gênica demonstrou que os genes *OsCel9D* e *OsXTH8* apresentaram expressão na região entre o pedicelo e a flor (Figura 2A e 2B). Com relação ao gene *OsCel9D*, verificou-se que os ecótipos de arroz vermelho apresentaram menor expressão relativa deste gene, quando comparados aos genótipos de arroz cultivado (Figura 2A), indicando que o gene *OsCel9D* apresenta relação com a repressão do processo de abscisão. Mutações no gene *OsCel9D* reduzem o alongamento celular e o conteúdo de celulose, mas aumentam o conteúdo de pectina (Zhou et al., 2006), sugerindo que *OsCel9D* esteja relacionado com os componentes da parede celular das plantas de arroz, o que justifica seu envolvimento com a repressão do caráter degrane.

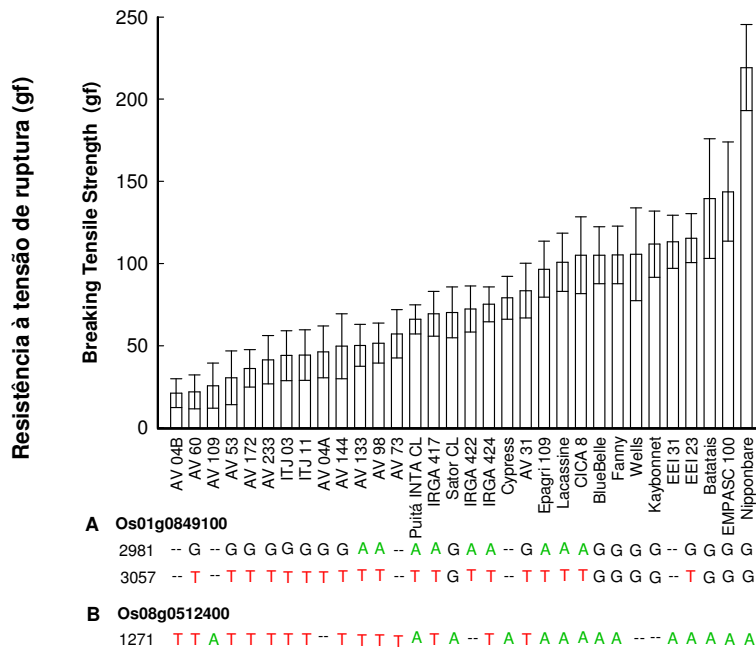


Figura 1. Relação entre o nível de degrane e os nucleotídeos nas posições: (A) 2981 e 3057 do gene *Os01g0849100*; (B) 1271 upstream do gene *Os08g0512400*. T= Timina, A= Adenina, G= Guanina. --= informação não disponível.

A expressão do gene *OsXTH8* foi relacionada com o caráter de degrane das sementes. O presente estudo verificou, apenas com exceção do ecótipo AV 60, que o padrão de expressão do gene *OsXTH8* mostrou relação direta com a presença do degrane, já que os maiores níveis de expressão relativa do gene foram verificados nos ecótipos de arroz vermelho (Figura 2B). O gene *OsXTH8* codifica a enzima *xyloglucan*

endotransglycosylase/hydrolase, a qual catalisa a clivagem de polímeros de xilogucana. Ainda, estas enzimas afrouxam a parede celular para a expansão celular regulada pelo turgor (Rose et al., 2002).

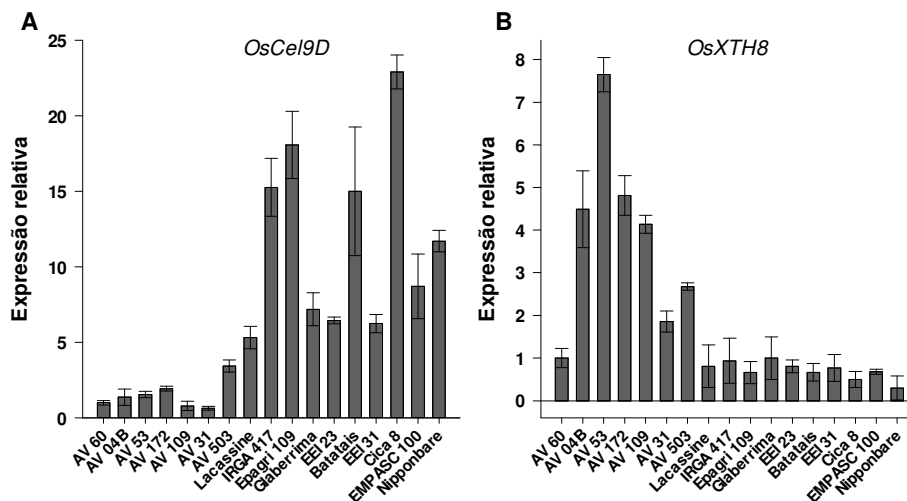


Figura 2. Expressão relativa dos genes *OsCel9D* (A) e *OsXTH8* (B) nos genótipos de arroz, aos dez dias após a polinização. Médias e desvio padrão apresentados.

CONCLUSÕES

A utilização dos principais genes relacionados ao degrane de sementes caracterizados em arroz cultivado *qSH1*, *Sh4* e *OsCPL1*, visando o desenvolvimento de tecnologias de silenciamento gênico relacionadas à diminuição do degrane, não serão eficientes em relação ao arroz vermelho existente no Sul do Brasil, sendo que os genes *OsXTH8*, *OsCel9D*, *Os01g0849100* e *Os08g0512400* devem ser considerados nestes procedimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HUANG, X. H. et al. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. **Nature Genetics**, Londres, v. 42, n. 11, p. 961-976, 2010.
- Jl, H. et al. Inactivation of the CTD phosphatase-like gene *OsCPL1* enhances the development of the abscission layer and seed shattering in rice. **Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 96-106, 2010.
- LI, C. B.; ZHOU, A. L.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, Michigan, v. 311, n. 5769, p. 1936-1939, 2006.
- ROSE, J. K. C. et al. The XTH Family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1421-1435, 2002.
- ZHOU, H. L. et al. *OsGLU1*, a putative membrane-bound endo-1,4-beta-D-glucanase from rice, affects plant internode elongation. **Plant Molecular Biology**, Waltham, v. 60, n. 1, p. 137-151, 2006.