



VARIABILIDADE NUCLEOTÍDICA DE GENES RELACIONADOS AO DEGRANE EM ARROZ VERMELHO

NUNES, A.L. (DEPLAV, – UFRGS, Porto Alegre/RS e IFRS, *Campus Sertão* – nunes.ander@gmail.com), BISPO, N.B. (DEPLAV, – UFRGS, Porto Alegre – nory.bispo@gmail.com), MEROTTO JR., A. (DEPLAV, – UFRGS, Porto Alegre – merotto@ufrgs.br)

RESUMO: Elevados níveis de degrane em ecótipos de arroz vermelho dificultam o manejo destas plantas daninhas. A caracterização nucleotídica de genes relacionados ao degrane permite avançar no conhecimento sobre a característica estudada. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade nucleotídica de genes relacionados direta e indiretamente ao degrane populações de arroz. A análise foi realizada a partir de 29 populações de arroz cultivado e daninho fenotipadas anteriormente com relação ao nível de degrane. Os genes analisados foram *qSH1*, *Sh4*, *CPL1*, *OsXTH8*, *Os02g0613200*, *Os03g0745400*, *Os05g0117300*, *Os08g0512400*, *Os10g0137700*, *Os11g0148700* e *Os01g0849100*. O DNA das populações foi extraído pelo método CTAB modificado a partir de amostras de folhas jovens. Os fragmentos gênicos a serem sequenciados foram amplificados através da reação de PCR, purificados e enviados para sequenciamento. As sequências dos genes obtidas foram editadas pelo programa BioEdit e alinhadas através do programa ClustalW. 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, nas posições 2981 e 3057, que estão relacionados ao degrane.

Palavras-chave: Single Nucleotide Polymorphism (SNP), biotecnologia, debulha natural

INTRODUÇÃO

Entre as espécies daninhas que infestam as lavouras de arroz, destaca-se o arroz vermelho como aquela que mais limita o potencial de produtividade do arroz. As infestações com arroz vermelho comumente são superiores a 10 plantas por m² e chegam em algumas lavouras a 1000 plantas por m². Em média, a presença de uma planta de arroz vermelho m⁻² reduz em 2,1% a produtividade de grãos do arroz cultivado (Balbinot Junior *et al.*, 2003).

A compreensão da variabilidade do degrane em arroz vermelho poderá ser utilizada para determinar práticas de manejo para reduzir os problemas com esta planta daninha em

lavouras de arroz irrigado. O arroz é a planta cultivada mais conhecida em nível genômico. As informações provenientes do sequenciamento de DNA e de outros estudos genéticos e moleculares têm resultado no aumento dos conhecimentos relacionados, por exemplo, a especiação, domesticação, ploidização e adaptação ecológica do gênero *Oryza*. A associação das informações provenientes do sequenciamento de DNA do arroz cultivado com a variabilidade genética de outras espécies ou de ecótipos silvestres do gênero *Oryza* possibilita o entendimento de caracteres que tornam as plantas de arroz vermelho daninhas, como por exemplo, o degrane das sementes. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade nucleotídica de genes relacionados direta e indiretamente ao degrane populações de arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações de arroz cultivado e arroz vermelho anteriormente fenotipadas quanto ao nível de degrane foram analisadas quanto à variabilidade nucleotídica de genes relacionados a esta característica. Os genes analisados foram *qSH1*, *Sh4*, *CPL1*, *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, 0,2 µM de cada *primer*, 1x PCR buffer, 0,2 µM dNTPs, 0,25 U de Taq DNA Polymerase, 0,3 µL de DMSO e água miliQ em um volume total de 20 µL. O protocolo de reação consistiu de 3 min de incubação a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação da fita de DNA; 60°C por 1 min, para o pareamento dos *primers*; 72°C por 1,5 min para extensão da fita de DNA e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min.

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 dos genes obtidas foram editadas pelo programa BioEdit (versão 7.0.5.3) (Hall, 1999). Após, estas sequências foram alinhadas através do programa ClustalW (versão 1.82) (Altschul *et al.*, 1997). O alinhamento foi feito utilizando as ferramentas BLASTn e BLASTx com base nas sequências dos genes previamente depositadas em banco de dados como *GenBank* e *Gramene*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção dos *Os08g0512400* e *Os01g0849100* os demais genes analisados não apresentaram variabilidade nucleotídica relacionada diretamente com os níveis de degrane.

indireta regulando a expressão de outros genes e até enzimas que possam estar associados ao 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 2). Na posição 2981 a mutação de G para A altera a formação de uma arginina para uma histidina na posição 994 da proteína. Já na posição 3057 do gene a alteração de uma T para uma G resulta na alteração de uma histidina para uma glutamina na posição 1019 da proteína. 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 os nucleotídeos G e G nas posições 2981 e 3057, respectivamente, tendem a possuir menor degrane (Figura 2).

Ao interpretar a Figura 2 deve ser considerado que a formação dos grupos dos níveis de degrane ocorreu de forma subjetiva. Dessa forma, se verifica que nas zonas de transição entre os grupos existem genótipos com o locus do gene que propicia o degrane elevado agrupados no grupo “médio degrane”, por exemplo. Assim, somente os genótipos Sator CL e EEI 23 são exceções a este comportamento. Sator CL possui o genótipo de baixo degrane, mas o fenótipo apresentado é de alto degrane do degrane. Já o genótipo EEI 23 possui comportamento contrário, ou seja, apresenta genótipo de alto degrane, mas o fenótipo de baixo degrane. Ao analisar a relação do SNP da região regulatória 5' do gene *Os08g0512400* com o nível de degrane concluiu-se que há outros genes atuando sobre o fenótipo do degrane, e a variação nucleotídica do gene *Os01g0849100* o torna um possível candidato. O gene *Os01g0849100* codifica uma proteína com um domínio que estimula a troca de nucleosídeos difosfatados por nucleosídeos trifosfatados (Berken *et al.*, 2005).

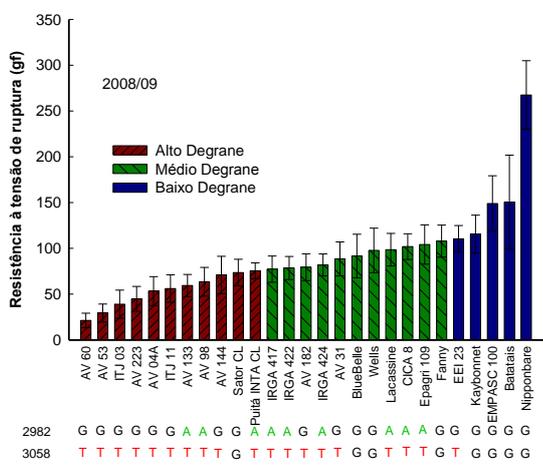


Figura 2. Relação entre o nível da Resistência à retenção de ruptura (RTR) e os nucleotídeos presentes nas posições 2981 e 3057 do gene *Os01g0849100*. T = Timina, A = Adenina, G = Guanina.

CONCLUSÕES

A variabilidade nucleotídica do gene *Os08g0512400* está relacionada com a mudança nos níveis de degrane. Na região regulatória 5' deste gene os genótipos que apresentam o nucleotídeo T na posição 1271 upstream do gene em geral possuem elevado degrane, enquanto que os genótipos que apresentam o nucleotídeo A possuem baixo degrane. Além disso, a variação nucleotídica do exon 5 do gene *Os01g0849100* apresentou dois SNPs, nas posições 2981 e 3057, que estão relacionados ao degrane em arroz. 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 os nucleotídeos G e G nas posições 2981 e 3057, respectivamente, tendem a possuir menor degrane.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- BALBINOT JUNIOR, A. A. et al. Competitividade de cultivares de arroz irrigado com cultivar simuladora de arroz-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 53-59, 2003.
- BERKEN, A.; THOMAS, C.; WITTINGHOFER, A. A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. **Nature**, London, v. 436, n. 7054, p. 1176-1180, 2005.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 95-98, 1999.
- REEVES, R.; BECKERBAUER, L. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1519, n. 1-2, p. 13-29, 2001.
- ZIÓLKOWSKI, P. et al. Immunohistochemical and proteomic evaluation of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate in invasive ductal carcinoma of the breast. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2009, n. 1, p. 91-96, 2009.