EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO DEGRANE EM ARROZ E SUA APLICAÇÃO PARA O MANEJO DE ARROZ VERMELHO

Anderson Luis Nunes[1]; Letícia Pereira Dias[2]; Aldo Merotto Junior[3], Ives C.G.R. Goulart[4], Valmir Kupas[5], Noryam Bervian Bispo[6]

Palavras-chave: debulha, glucanases, real time, hidrolases.

INTRODUÇÃO

A debulha natural (degrane) das sementes propicia a dispersão do arroz vermelho. Este caráter permite que a maior parte das sementes produzidas seja distribuída sobre a superfície do solo antes e durante a colheita, evitando que seja removida do sistema de produção. A manutenção do banco de sementes do solo com arroz vermelho é a grande fonte que propicia a ocorrência de altas infestações com arroz vermelho nas áreas cultivadas com arroz. Portanto, para se subsidiar estratégias sustentáveis de controle do arroz vermelho a longo prazo, é fundamental investir em tecnologias que reduzam a debulha natural desta planta daninha.

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, como o arroz vermelho, esta camada de células é contínua em toda a zona de abscisão. Já nas plantas que possuem pouca debulha natural esta camada é descontínua e completamente ausente na região dos feixes vasculares (LI et al., 2006). 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 β-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).

O conhecimento do comportamento da expressão de genes relacionados à debulha natural permite conhecer melhor os mecanismos envolvidos no degrane e, assim, elaborar formas eficientes de reduzir a presença do arroz vermelho nas lavouras de arroz irrigado. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar a expressão dos genes relacionados ao degrane em populações de arroz contrastantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos de arroz vermelho AV 31 e AV 60 e as cultivares Lacassine e Batatais, que possuem níveis contrastantes de degrane dos grãos, tiveram os níveis de expressão de genes relacionados ao degrane e a parede celular mensurados através da técnica RT-PCR em tempo real. Perfilhos com espigas polinizadas no mesmo dia e hora foram coletadas no mesmo momento aos dez dias após a polinização e encaminhados para o laboratório. Cada genótipo contou com três repetições biológicas e cada repetição biológica contou com quatro replicatas. Uma quantidade de 3 µg de RNA total de cada tratamento foi tratada com DNAse® I. Posteriormente, procedeu-se a formação da fita complementar com a transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen) a partir de 3 µg de RNA.

A amplificação realizada pela RT-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. Para a quantificação relativa, procedeu-se o

[1] Eng. Agr., Mestre em Fitotecnia, Instituto Federal do Rio Grande do Sul – *Campus* Sertão, Rodovia RS 135, km 25, Distrito Eng. Luiz Englert, Sertão –RS, anderson.nunes@sertao.ifrs.edu.br.
[2] Engª. Agrª., Universidade Federal do RioGrande do Sul, 00137682@ufrgs.br.
[3] Eng. Agr., Ph. D. in Ecology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, merotto@ufrgs.br.
[4] Eng. Agr., Mestre em Fitotecnia, Universidade Federal do RioGrande do Sul, goulart@ufrgs.br.
[5] Acadêmico do curso de Agronomia, Universidade Federal do RioGrande do Sul, valmir_kupas@hotmail.com.
[6] Engª. Agrª., Mestre em Fitotecnia, Universidade Federal do RioGrande do Sul, nory.bispo@gmail.com.

ajuste das curvas pela análise da eficiência da PCR, através do software livre LinRegPCR (versão12.2) que analisa a curva exponencial de amplificação, valores de R>0,99, eficiência entre 1,8 e 2 e números de pontos maiores que 4 foram aceitos, os demais foram descartados não entrando na análise. Para análise dos dados, foram colhidos valores de Ct e realizadas médias das amostras em quadriplicatas com desvio padrão inferior a 0,5 de indivíduos calibradores e indivíduos alvo para cada gene. Utilizou-se a fórmula $\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{28S}) - (Ct_{calibrador} - Ct_{28S})$ para a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ fornece a dimensão de variação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente, existe a comprovação de que três genes tem efeito sobre o degrane, a seguir: qSH1, Sh4 e OsCPL1. O gene qSH1 não foi expresso na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização nos genótipos avaliados. Na subespécie japônica a substituição do nucleotídeo G por T na região regulatória 5' deste gene, a 11841 bases *upstream*, causa a perda da expressão do gene qSH1 somente na região entre o pedicelo e a flor (KONISHI et al., 2006). Cabe lembrar que os quatro genótipos utilizados neste trabalho pertencem a subespécie indica e por isso podem apresentar resultados contrastantes com estudos realizados com a subespécie japônica.

A expressão do gene Sh4 não mostrou uma relação direta com a ocorrência do degrane (FIGURA 1). De fato, a cultivar Batatais não diferiu dos genótipos AV 60 e AV 31 quanto a expressão deste gene. A cultivar Lacassine apresentou um menor nível de expressão em comparação aos demais genótipos. A expressão do gene Sh4 foi detectada na região entre o pedicelo e a flor em diferentes momentos na cultivar da subespécie indica CL 16 e em um ecótipo do arroz silvestre *Oryza nivara* (LI et al., 2006). Até os seis dias após a polinização, não houve diferença na expressão do gene Sh4 entre a espécie cultivada e a silvestre. Após, os níveis de expressão foram maiores na espécie silvestre em relação a cultivar CL 16 que possui um menor nível de degrane (LI et al., 2006).

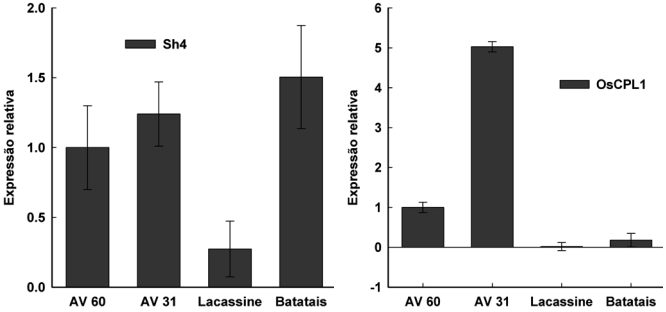

FIGURA 1. Expressão relativa de genes com relação comprovada sobre o degrane, aos dez dias após a polinização.

O gene OsCPL1 foi expresso na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização e apresentou uma relação direta e positiva com o nível de degrane (FIGURA 1). Nos genótipos que possuem degrane, AV 60 e AV 3, a expressão do gene foi superior em relação aos cultivares que possuem menor nível de degrane. Dessa forma, a expressão do gene OsCPL1 sugere relação com a ativação do processo de abscisão. O padrão de expressão do gene OsCPL1 foi detalhado na literatura através da geração de plantas transgênicas expressando o gene repórter GUS sobre o controle do promotor do gene OsCPL1 (JI et al., 2010). Assim, análises histoquímicas mostraram expressão do gene GUS na região da camada de abscisão no início do desenvolvimento das sementes, e com o progresso da maturação fisiológica das sementes a expressão do gene foi diminuindo. Além disso, foi observado que quanto maior a expressão do gene OsCPL1 menor o nível de

degrane. Este padrão de expressão sugere que o gene OsCPL1 está envolvido na repressão do desenvolvimento da camada de abscisão em sementes de arroz. Dessa forma, a relação entre a expressão deste gene e o nível de expressão em AV 60, AV 31, Lacassine e Batatais se apresentou ao contrário do que era esperado. Pois, nestes genótipos e cultivares a expressão do gene estaria relacionado com a presença do degrane e não com a repressão do degrane, como o observado nas análises histoquímicas.

Além dos três genes com relação comprovada sobre o degrane, seis genes relacionado à parede celular foram avaliados quanto à expressão relativa. As enzimas codificadas por estes genes estão relacionadas à quebra ligações químicas que permitem desde uma nova conformação da parede celular até a degradação das mesmas (ROBERTS et al., 2002). Os genes Os09g0530200 e Os11g0462100 que codificam enzimas do tipo endo-beta-1,4-glucanase e glycoside hydrolase, respectivamente, não apresentaram expressão na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização.

Os genes Os04g04480900 e Os02g0170900 que codificam enzimas do tipo glycoside hydrolase e lytic transglycosylase, respectivamente, foram expressos, mas não apresentaram uma relação direta com nível de degrane (FIGURA 2). Para o gene Os04g04480900 a expressão relativa em Lacassine foi de quase cinco vezes em relação aos demais tratamentos que mantiveram expressão relativa igual ao controle AV 60. Já expressão relativa do gene Os02g0170900 nos tratamentos foi semelhante ao controle.

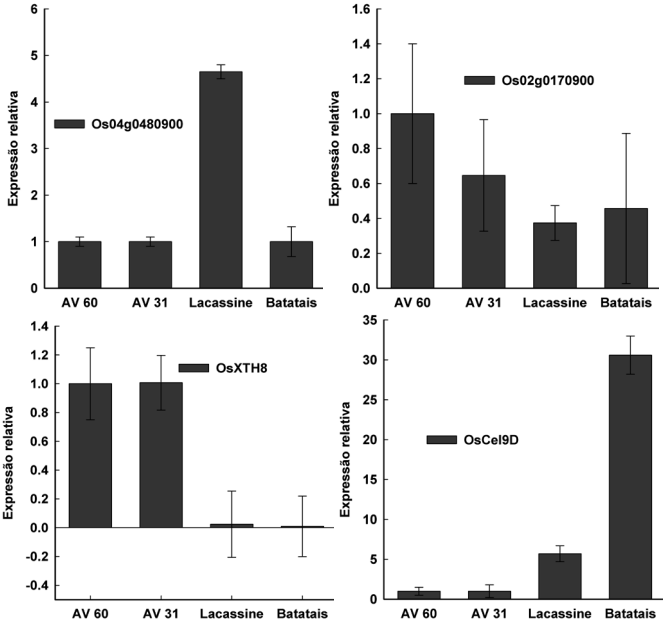

FIGURA 2. Expressão relativa de genes relacionados à parede celular, aos dez dias após a polinização.

O padrão de expressão do gene OsXTH8, que codifica uma enzima xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase, sugere haver uma relação direta e positiva com a presença do degrane, pois nos genótipos de arroz vermelho a expressão do gene foi superior em comparação às cultivares de arroz onde o degrane é ausente. As enzimas do tipo xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase catalisam a clivagem de polímeros de xiloglucam e a sua transferência para outros polímeros. Assim, durante o processo de abscisão a expressão deste gene poderia facilitar a queda natural do grão através da

clivagem de polímeros da parede celular permitindo que as células da camada de abscisão rompessem com o menor esforço possível. Uma aplicação futura deste resultado se dá através do uso de técnicas de biologia molecular, como o silenciamento gênico, que poderia inativar a expressão deste genes em plantas de arroz vermeho, e desta forma reduzir o nível de degrane nas plantas. Com a ausência do degrane seria possível por exemplo a retirada das sementes de arroz da lavoura no momento da colheita, reduzindo gradualmente o banco de sementes deste planta daninha na área cultivada.

A expressão relativa do gene OsCel9D também apresentou uma relação direta com o degrane. Entretanto, esta relação é inversa daquela presente no padrão de expressão do gene OsXTH8, pois para o gene OsCel9D a expressão está relacionada com a repressão do processo de abscisão (FIGURA 2). Para o ecótipo de arroz vermelho AV 31 o nível de expressão foi igual ao controle AV 60, enquanto que nas cultivares de arroz Lacassine e Batatais, a expressão relativa foi de cinco e 30 vezes superior ao controle, respectivamente (FIGURA 2). O gene OsCel9D codifica uma proteína do tipo endo-1,4-beta-glucanase. No genoma do arroz, endo-1,4-beta-D-glucanases formam uma família gênica com 15 membros e cada um possui um padrão de expressão distinto em diferentes órgãos. Esta família possui papel importante nos processos de crescimento e desenvolvimento em plantas de arroz (ZHOU et al., 2006). 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. Dessa forma, a mudança dos componentes da parede celular, causada pela maior nível de expressão do gene, poderia dificultar o processo de abscisão em comparação ecótipos que apresentam degrane. Como a expressão do gene OsCel9D parace estar relacionada com a repressão do degrane, a superexpressão deste gene através de técnicas de biologia molecular reduziria o nível de degrane e, desta forma, até eliminar os problemas causados pelas plantas de arroz vermelho nas lavouras de arroz irrigado em vários locais do mundo.

CONCLUSÃO

No presente trabalho, houve uma relação positiva entre o nível de expressão dos genes OSCPL1 e OsXTH8 e o degrane, indicando que o silenciamento gênico possa ser uma técnica adequada para reduzir o problema, reduzindo assim, o banco de sementes de arroz vermelho nas lavouras. Já o gene OsCel9D mostrou uma relação inversa entre o nível de expressão e o nível de degrane das sementes, indicando que a superexpressão deste gene em plantas de arroz vermelho reduziria o nível de degrane e consequentemente a adição de sementes no banco de sementes do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JI, 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, v. 61, n. 1, p. 96-106, 2010.

KONISHI, S., et al. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. Science, v. 312, n. 5778, p. 1392-1396, 2006.

LI, C. B.; ZHOU, A. L.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. Science, v. 311, n. 5769, p. 1936-1939, 2006.

ROBERTS, J. A.; ELLIOTT, K. A.; GONZALEZ-CARRANZA, Z. H. Abscission,dehiscence, and other cell separation processes. Annual Review of Plant Biology, v. 53, n., p. 131-158, 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, English, v. 60, n. 1, p. 137-151, 2006.