

# GENES RELACIONADOS À DORMÊNCIA DAS SEMENTES E SUA IMPORTÂNCIA PARA O MANEJO DE ARROZ VERMELHO

Catarine Markus<sup>1</sup>; Aldo Merotto Júnior<sup>2</sup>; Cádia Meneguzzi<sup>3</sup>; Valmir Kupas<sup>4</sup>

Palavras-chave: arroz daninho, sementes dormentes, expressão gênica e real time.

## INTRODUÇÃO

As sementes de plantas daninhas frequentemente possuem elevada dormência, o que permite que as mesmas persistam no solo por vários anos antes de iniciar a germinação (Li et al., 2011). Este é um dos mecanismos que torna o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) a planta daninha com maior importância na cultura do arroz irrigado, pois além de permitir que as sementes permaneçam viáveis no solo, a dormência ocasiona germinação, emergência e desenvolvimento escalonado, o que dificulta o seu controle. Estas dificuldades ocorrem principalmente no manejo pós-semeadura da cultura, já que inviabiliza alguns métodos de controle ou tornam estas práticas bastante onerosas. A falta de controle adequado do arroz vermelho contribui para a reinfestação e a contínua realimentação do banco de sementes do solo. Desta forma, para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle, é fundamental investir em tecnologias que possibilitem a redução da dormência das sementes desta planta daninha.

A dormência das sementes em arroz cultivado vem sendo estudada há muitos anos (Gu et al., 2003). No entanto, a regulação deste processo ainda é pouco conhecida, sendo considerado por alguns autores como o fenômeno menos compreendido no processo fisiológico das sementes. Recentemente, foram relatados estudos sobre o envolvimento dos genes *Oscyp707A5* (Liu et al., 2011), *OsMADS29* (Li et al., 2011) e *Sdr4* (Sugimoto et al., 2010) no caráter de dormência das sementes em arroz cultivado. No entanto, estes estudos foram realizados em momentos isolados do desenvolvimento da semente e são inexistentes para arroz vermelho. Através dos resultados encontrados naqueles trabalhos é possível considerar os três genes citados como possíveis candidatos a desempenhar algum papel nos mecanismos de dormência das sementes em arroz vermelho. Este entendimento permite conhecer melhor os mecanismos envolvidos neste processo e, assim, desenvolver formas eficientes de reduzir a presença do arroz vermelho nas lavouras orizícolas. O presente estudo visou avaliar conjuntamente a expressão relativa dos genes *Oscyp707A5*, *Sdr4* e *OsMADS29* em etapas fisiológicas distintas da semente, de forma a verificar a relação destes genes com o caráter de dormência, além de verificar o comportamento de genótipos de arroz quanto à dormência das sementes ao longo de três anos dispostas no banco de sementes do solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas etapas, sendo que a primeira está relacionada à fenotipagem de genótipos de arroz e a segunda ao estudo de expressão dos genes *Oscyp707A5*, *Sdr4* e *OsMADS29* em fases fisiológicas distintas no desenvolvimento das sementes de arroz. O material vegetal constituiu de duas cultivares de arroz, sete ecótipos de arroz vermelho e da espécie silvestre *Oryza glaberrima*. A análise fenotípica foi realizada

<sup>1</sup> Engº. Agrº, Doutoranda Depto Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre - RS, catarine.markus@gmail.com.

<sup>2</sup> Eng. Agr., PhD, UFRGS.

<sup>3</sup> Bolsista IC, Acadêmica da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

<sup>4</sup> Bolsista IC, Acadêmico da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

com sementes maduras colhidas na safra de 2008/09. Em fevereiro de 2009, aproximadamente 200 sementes por repetição foram acondicionadas em sacos de pano do tipo tule. Os sacos foram enterrados a cinco centímetros de profundidade, em solo hidromórfico, acondicionados em tanques de concreto. A disposição das sementes nos tanques visou proporcionar condições semelhantes àquelas encontradas no banco de sementes do solo em condições de campo. O experimento foi organizado em delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições, onde cada saco correspondeu a uma unidade experimental. As análises da dormência foram realizadas sempre no mês de outubro, em 2010, 2011 e 2012, que correspondeu a 19, 31 e 43 meses após a deposição das sementes no solo, respectivamente. No momento das avaliações, os sacos contendo as sementes foram retirados do solo e conduzidos ao laboratório, onde foram lavados com água destilada. As análises iniciais constituíram da contagem das sementes germinadas a campo e sementes que estavam em processo de germinação (radícula  $\geq$  1mm). As sementes que ainda não haviam germinado foram submetidas a condições ideais para o processo de germinação, com temperatura de 25°C. Dez dias após foi realizada a contagem do número de sementes germinadas (radícula  $\geq$  1mm). As sementes firmes remanescentes foram submetidas ao método de superação de dormência, através da exposição à temperatura de 50°C em estufa por seis dias. Posteriormente, estas foram colocadas novamente para germinar por dez dias. Foram consideradas sementes dormentes aquelas que apresentaram germinação após o processo de quebra de dormência. As sementes não germinadas, mesmo após o método de superação da dormência, foram submetidas ao teste de tetrazólio (Brasil, 1992), para verificar a viabilidade do embrião. Após, os dados foram submetidos ao teste F da ANOVA e quando significativo, foi aplicado o teste Tukey ( $p < 0,05$ ), para comparação entre médias.

Através dos resultados obtidos no primeiro e segundo ano da análise fenotípica, foram escolhidos sete genótipos para realizar a análise de expressão dos genes *Oscyp707A5*, *Osmads29* e *SDR4*, através da técnica RT-PCR em tempo real. A relação da expressão gênica com o mecanismo de dormência foi analisada em duas etapas distintas: i) durante a formação da semente (coleta da região do embrião em formação, aos 14 dias após a antese); ii) semente madura (embrião maduro), quando as plantas apresentaram mais de dois terços de suas panículas totalmente dobradas e sementes com resistência à pressão da unha. Nas duas etapas de coleta, cada amostra foi composta por 30 embriões coletados da panícula de uma mesma planta, equivalente a aproximadamente 30 mg de material, que correspondeu a uma repetição. A extração do RNA foi realizada pelo método Trizol (Invitrogen). A análise da reação de RT-PCR em tempo real foi iniciada pela interpretação da curva de dissociação. O ajuste das curvas foi realizado pela análise da eficiência da PCR através do software livre LinRegPCR (versão 12.2). Valores de  $R > 0,99$ , com eficiência entre 1,8 e 2 e números de pontos maiores que 4 foram aceitos, os demais foram descartados. Os níveis de expressão relativa foram realizados através da fórmula  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{28S}) - (Ct_{calibrador} - Ct_{28S})$ , 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

A ANOVA da dormência das sementes, efetuada nos anos de 2010, 2011 e 2012, foi significativa para a interação entre os dois fatores testados, ano e genótipo. Após 19 meses que as sementes estavam enterradas no solo, cinco dos sete ecótipos de arroz vermelho analisados mostraram dormência superior a 80% (Tabela 1). Os ecótipos AV 15 e AV 172, juntamente com a espécie *O. glaberrima*, apresentaram taxa de dormência moderada, que variou de 60 a 70% (Tabela 1). Também no primeiro ano a menor taxa de dormência foi das cultivares IRGA 417 e Kaybonnet (Tabela 1). Após 31 meses presentes no banco de sementes do solo, as cultivares apresentaram praticamente ausência de dormência. Nas sementes da espécie silvestre a taxa de dormência foi inferior a 5%, sendo juntamente com as cultivares de arroz e com o ecótipo AV 508, classificadas com baixo nível de dormência.

Os ecótipos AV 223 e AV 511 apresentaram alta dormência, com taxas superiores a 60% (Tabela 1). Após 43 meses, a espécie silvestre *O. glaberrima* mostrou comportamento semelhante as cultivares e apresentou ausência de sementes dormentes (Tabela 1). Os ecótipos AV 15, AV 501 e AV 503 apresentaram dormência intermediária. No entanto, neste mesmo momento os ecótipos de arroz vermelho analisados ainda apresentavam taxa de dormência que variava de 10 a 50% (Tabela 1). Mesmo que valores de dormência próximos a 10% possam ser considerados baixos, grande parte das lavouras orizícolas apresenta limitada adoção de sistemas de rotação de culturas, o que indica que todo ano o banco de sementes é renovado, e intensifica o problema de controle de arroz vermelho. Outro estudo também verificou que sementes de nove ecótipos de arroz vermelho apresentavam-se dormentes dois anos após sua dispersão no solo, enquanto que as sementes das cultivares, Lemont e Mars, não apresentavam sementes viáveis após cinco meses depositadas no solo (Noldin et al., 2006). Estas informações mostram que o caráter dormência tem papel significativo na perpetuação desta espécie daninha, ainda que o comportamento e intensidade da dormência ao logo do tempo são variáveis, o que faz com que este mecanismo de sobrevivência seja bastante eficiente. Isto torna a fenotipagem uma etapa importante no estudo da dormência, principalmente para possibilitar o melhor entendimento das análises moleculares.

TABELA 1. Análise da dormência das sementes aos 19, 31 e 43 meses após deposição no solo.

Genótipos	Tempo após deposição das sementes no solo								
	1º Ano (2010)- 19 meses		2º Ano (2011)-31 meses		3º Ano (2012)- 43 meses		Dormência das sementes (%)		
AV 15	AB	69,3	a	B	11,0	b	AB	31,4	c
AV 172	B	57,6	a	B	15,1	b	C	11,7	b
AV 223	AB	79,6	a	A	59,8	b	A	49,3	b
AV 501	A	87,9	a	B	14,4	c	AB	32,6	b
AV 503	A	84,6	a	B	17,4	b	B	27,7	b
AV 508	AB	81,6	a	C	1,4	c	C	9,84	b
AV 511	A	91,7	a	A	64,6	b	A	40,26	b
Glaberrima	AB	67,5	a	C	0,0	b	D	0,0	b
IRGA417	C	28,3	a	C	0,0	b	D	0,0	b
Kaybonnet	D	0,1	ns	C	0,0		D	0,0	
CV (%)								23,4	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e antecedidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup> Coeficiente de variação.

A análise da expressão gênica verificou, tanto nas sementes em formação, quanto nas sementes maduras, que o gene *OsCYP707A5* foi expresso em todos os genótipos analisados (Figura 1A e B). No entanto, não foi possível observar relação da expressão do gene *OsCYP707A5* com o caráter de dormência das sementes, pois genótipos contrastantes, como *O. glaberrima* e AV 223, apresentaram nível semelhante de expressão relativa (Figura 1A e B). Outro estudo verificou que a expressão do gene *OsCYP707A5* em embriões de sementes de arroz cultivado, seis meses após a colheita das sementes, foi relacionada ao maior índice de dormência das sementes, e mostrou-se ainda envolvido no catabolismo de ABA (Liu et al., 2011). No entanto, no presente estudo não fica evidente que este gene tenha ação sobre o caráter de dormência em arroz vermelho.

O gene *OsMADS29* apresentou expressão relativa na região do embrião no momento em sementes em formação e em sementes maduras (Figura 1C e D). Nas sementes em formação verificou-se maior nível de expressão nas cultivares e na espécie silvestre testada. Nas sementes maduras, a cultivar Kaybonnet apresentou expressão relativa 150 vezes superior aos ecótipos de arroz vermelho AV 511 e AV 223, que apresentam alta dormência. Ainda, a cultivar IRGA 417, *O. glaberrima* e AV 508 mostraram expressão gênica cerca de 80 vezes superior aos ecótipos de arroz vermelho AV 511 e AV 223 (Figura 1C e D). Um trabalho em gel de agarose, verificou que o tempo necessário para percepção

inicial da expressão do gene *OsMADS29* foi relacionado diretamente com o tempo necessário para a emissão da radícula em sementes de arroz cultivado (Li et al., 2011a). Isto poderia sugerir que a expressão do gene *OsMADS29* está relacionada a etapas específicas da germinação também em arroz vermelho, já que no presente estudo o gene *OsMADS29* apresentou maior expressão em genótipos com baixa dormência.

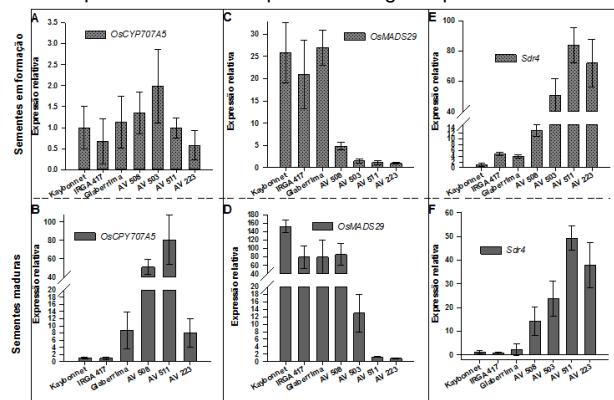


FIG. 1. Expressão relativa dos genes: OsCYP707A5 em sementes em formação (A) e em sementes maduras (B); OsMADS29 em sementes em formação (C) e em sementes maduras (D); Sdr4 em sementes em formação (E) e em sementes maduras (F). Médias e desvio padrão apresentados.

O gene *Sdr4* também foi expresso na região do embrião em formação e embrião de sementes maduras (Figura 1D e E). A expressão deste gene pode estar relacionada com o caráter dormência das sementes, já que a expressão relativa foi mais pronunciada nos genótipos com alta dormência, em ambas as etapas fisiológicas analisadas (Figura 1D e E). Através de estudos de QTLs para este caráter foi verificado que a região *qDGR7*, onde está localizado o gene *Sdr4*, apresenta forte influência sobre o caráter de dormência (Li et al., 2011). A expressão do *Sdr4* é regulada por *OsVP1*, que atua sobre o potencial de dormência das sementes e reprime a expressão de genes de germinação (Sugimoto et al., 2010). Assim, sugere-se que *Sdr4* aja como um regulador intermediário da dormência na maturação das sementes (Sugimoto et al., 2010). Isto explica o fato do gene *Sdr4* ter apresentado relação direta com o caráter dormência nos genótipos testados neste estudo.

## CONCLUSÃO

Os ecótipos de arroz vermelho apresentam alta dormência, com sementes viáveis após 43 meses presentes no banco de sementes do solo. Nas sementes em formação e maduras os genes *OsCYP707A5*, *Sdr4* e *OsMADS29* apresentam, respectivamente, relação ausente, positiva, e negativa com o caráter dormência das sementes de arroz vermelho. Estas informações podem ser utilizadas para o desenvolvimento de ferramentas de biotecnologia que contribuem para o manejo do arroz vermelho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL, Ministério Agricultura e Reforma Agrária. *Regras para análise sementes*. Brasília: 1992. 365 p.
- GU, X. Y., CHEN, Z. X. e FOLEY, M. E. Inheritance of seed dormancy in weedy rice. *Crop Science*, v. 43, n. 3, p. 835-843, 2003.
- LI, W., et al. Quantitative trait loci for seed dormancy in rice. *Euphytica*, v. 178, n. 3, p. 427-435, 2011.
- LIU, F., et al. Sequence variation and expression analysis of seed dormancy- and germination-associated ABA- and GA-related genes in rice cultivars. *Frontiers Plant Science*, v. 2, n., p. 1-13, 2011.
- NOLDIN, J. A., et al. Seed longevity of red rice buried in soil. *Planta Daninha*, v. 24, n. 4, p. 611-620, 2006.
- SUGIMOTO, K., et al. Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *PNAS-USA*, v. 107, n. 13, p. 5792-5797, 2010.