

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

Catarine Markus¹; Aldo Merotto Júnior²; Cátia Meneguzzi³; Valmir Kupas⁴

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

¹ Eng^a. Agr^a., Doutoranda Depto Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre - RS, catarine.markus@gmail.com.

² Eng. Agr., PhD, UFRGS.

³ Bolsista IC, Acadêmica da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

⁴ 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 ≥ 1 mm). 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 ≥ 1 mm). 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 paniculas totalmente dobradas e sementes com resistência à pressão da unha. Nas duas etapas de coleta, cada amostra foi composta por 30 embriões coletados da panicula 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 longo 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 ¹ (%)									
									23,4

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e antecederidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05). ¹ 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 dormiência.

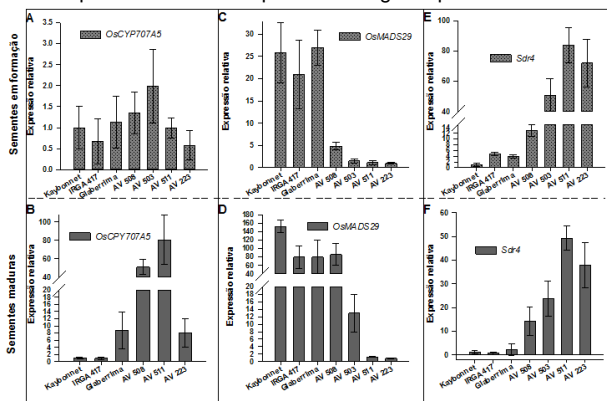


FIG. 1. Expressão relativa dos genes: *OsCYP707A5* em sementes em formação (A) e em sementes maduras (B); *OsMADS29* em sementes em formação (C) e em sementes maduras (D); *Sdr4* em sementes em formação (E) e em sementes maduras (F). Médias e desvio padrão apresentados.

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 dormiência das sementes, já que a expressão relativa foi mais pronunciada nos genótipos com alta dormiência, 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 dormiência (Li et al., 2011). A expressão do *Sdr4* é regulada por *OsVP1*, que atua sobre o potencial de dormiência 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 dormiência na maturação das sementes (Sugimoto et al., 2010). Isto explica o fato do gene *Sdr4* ter apresentado relação direta com o caráter dormiência nos genótipos testados neste estudo.

CONCLUSÃO

Os ecótipos de arroz vermelho apresentam alta dormiência, 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 dormiência 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.