

RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *OsMADS29* E AUSÊNCIA DO CARÁTER DE DORMÊNCIA EM ARROZ VERMELHO

Catarine Markus¹, Cádia Meneguzzi², Aldo Merotto Júnior³, José Ari Nenê Barcelos⁴

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

INTRODUÇÃO

A dormência das sementes é uma característica na qual sementes viáveis não apresentam germinação, mesmo sob condições ambientais favoráveis a este processo (Goggin et al., 2010). A elevada dormência possibilita que as sementes persistam no solo por alguns anos, antes de iniciar a germinação. Esta característica contribui para que o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) seja a planta daninha com maior importância na cultura do arroz irrigado, pois além de permitir que as sementes permaneçam viáveis no banco de sementes do solo, a dormência ocasiona a germinação escalonada, o que dificulta o seu controle.

O estado de dormência das sementes se caracteriza por baixa atividade metabólica e insensibilidade temporária aos sinais de promotores de crescimento (Graeber et al., 2012). No entanto, em algumas sementes as atividades metabólicas podem ser apenas ligeiramente diferente das sementes sem dormência. Assim, uma semente dormente pode atingir praticamente todos os passos metabólicos necessários para completar a germinação, mas por algum motivo desconhecido o eixo embrionário (radícula) não alonga (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). A complexidade do assunto e a escassa quantidade de estudos que descrevem os mecanismos de dormência das sementes em arroz vermelho, faz com que aja a necessidade de maior compreendimento dos mecanismos envolvidos nos processos de germinação e dormência das sementes. Para desta, desenvolver formas eficientes de reduzir a presença do arroz vermelho nas lavouras orizícolas.

Recentemente, o gene *OsMADS29* apresentou importância para estudos de dormência em sementes de arroz vermelho. Este gene apresentou elevada expressão em espiguetas e panículas, e pouca expressão em brotos, folhas e raízes (Li et al., 2011). Ainda, a percepção inicial da expressão do gene *OsMADS29* correspondeu diretamente com a etapa final da germinação, a emissão da radícula. Assim, o gene *OsMADS29* pode estar relacionado com a ausência do caráter de dormência, já que é expresso preferencialmente durante a maturação e germinação das sementes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar o envolvimento do gene *OsMADS29* nas fases de germinação na região do embrião das sementes de arroz cultivado, arroz vermelho e espécie silvestre *Oryza glaberrima* e desta forma verificar sua relação com o caráter dormência das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre/RS. Através dos resultados obtidos em trabalhos anteriores de análise fenotípica da dormência das sementes, foram escolhidos sete genótipos para realizar a análise de expressão do gene *OsMADS29* através da técnica RT-PCR em tempo real. Os

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

² Bolsista IC Acadêmica da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

³ Eng. Agr.,PhD, UFRGS.

⁴ Bolsista IC Acadêmico da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

genótipos utilizados constituíram das cultivares IRGA 417 e Kaybonnet, dos ecótipos de arroz vermelho AV 223, AV 503, AV 508 e AV 511 e da espécie silvestre *Oryza glaberrima*. A relação da expressão gênica com o mecanismo de dormência e germinação foi analisada em cinco etapas distintas no processo de germinação das sementes: Primeiramente as sementes maduras foram submetidas ao processo de superação de dormência, com exposição à temperatura de 50°C, em estufa por seis dias, e após foram colocadas para germinar em papel germinador, mantidos a temperatura de 25°C. As coletas foram realizadas às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após as sementes estarem expostas à germinação (HAEG). Neste momento, a casca era retirada e 30 embriões originados de uma mesma planta (aproximadamente 30 mg de material) constituiria uma repetição, sendo que cada genótipo contou com três repetições. O material foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido (LN_2). 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 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{28S}) - (Ct_{\text{calibrador}} - Ct_{28S})$, 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.

No momento da coleta de material para extração de RNA foram verificados os estágios de germinação em que cada genótipo encontrava-se. A classificação foi realizada conforme a classificação trifásica sugerida por Bewley, 1997, a qual sugere que a fase I, chamada de embebição, ocorre absorção inicial rápida de água; seguida por uma fase de platô, fase II; na fase III finalmente ocorre um aumento adicional na absorção de água, que acontece quando o eixo embrionário alonga e rompe as camadas que envolvem a semente. Assim, o sinal que evidencia que a germinação está completa é a formação e saída da radícula, que caracteriza o processo chamado de germinação visível (Bewley, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as etapas de germinação observou-se que mesmo utilizando sementes com dormência superada, existiam diferenças na velocidade de ocorrência das fases de germinação entre os genótipos (Figura 1), estas diferenças foram levadas em consideração para a análise de expressão. No primeiro momento, às 12 HAEG, a diferença das fases de germinação ainda não era visível, pois as sementes de todos os genótipos mostravam-se sem alterações (SA) (Figura 1). Já às 24 HAEG a cultivar IRGA 417 apresentava-se em fase de embebição (FI), enquanto que as sementes dos demais genótipos continuavam na fase SA. Às 36 HAEG as sementes da cultivar IRGA 417 aumentaram de tamanho e foram classificadas em fase II de platô (FII), as sementes dos demais genótipos estavam em FI (Figura 1). Às 48 HAEG foi possível evidenciar claramente a diferença de velocidade de germinação, pois enquanto as sementes de alguns genótipos como AV 503 e AV 508 continuavam em FI, outros genótipos, AV 223, AV 511, Kaybonnet e *O. glaberrima* estavam em FII. Neste mesmo momento a cultivar IRGA 417 apresentava-se na fase III (FIII) (Figura 1), onde ocorre um aumento adicional na absorção de água, que acontece quando o eixo embrionário alonga e rompe as camadas que envolvem a semente (Bewley, 1997). Às 60 HAEG os genótipos AV 223 e AV 503 permaneciam em FII, os genótipos AV 503 e AV 511 estavam em FIII, os genótipos IRGA 417, Kaybonnet e *O. glaberrima* já haviam germinado, com presença de radícula $>1\text{mm}$ (G) (Figura 1). Isto sugere que em cada fase da germinação pode existir variações nos níveis de expressão dos genes envolvidos neste processo.

A velocidade de germinação das sementes é muito variável entre espécies e podem haver variações inclusive entre ecótipos (Alonso-Blanco et al., 2003). Em arroz esta característica é utilizada como uma das ferramentas para distinguir as subespécies indica e japonica, já que a germinação das sementes de arroz indica é geralmente mais rápida do

que a germinação em sementes de arroz japônica (Miura et al., 2002). No entanto, em muitos trabalhos estas diferenças não são consideradas, pois são realizadas apenas análises de presença e ausência de germinação e elas não abordam as fases deste processo.

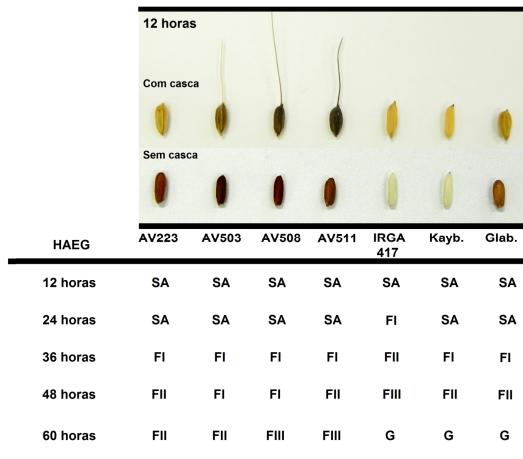


FIGURA 1. Etapas de germinação dos genótipos de arroz, observados às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação (HAEG). Sementes sem alteração (SA), em fase I de embebição (FI), fase II de platô (FII), exposição da radícula na fase III (FIII) e germinação com presença de radícula >1mm (G).

O gene *OsMADS29* foi expresso na região do embrião às 12, 24, 36, 48 e 60 HAEG (Figura 2). Observou-se que a expressão relativa apresentada pelos genótipos durante às 12 e 24 horas após embebidas foi muito semelhante. Ainda, nas primeiras 24 horas as cultivares e a espécie silvestre *O. glaberrima* apresentaram maior expressão relativa (Figura 2 A e B). Às 36 horas verifica-se redução da expressão relativa da cultivar IRGA 417 e aumento da expressão relativa do ecótipo AV 511 que apresenta expressão relativa 9 vezes maior que a cultivar controle, Kaybonnet (Figura 2 C). Às 48 horas, o ecótipo AV 511 apresentou elevação no nível de expressão relativa, ficando 30 vezes superior a cultivar Kaybonnet. Neste mesmo momento, o ecótipo AV 503 também apresentou pronunciada expressão relativa. Cabe ressaltar que, nesta análise não foi possível quantificar a expressão no ecótipo AV 508 (Figura 2 D), pois a curva de amplificação não formou-se de modo correto e observou-se ainda a formação de vários picos na curva de dissociação, indicando a formação de produtos inespecíficos. Na última avaliação do processo de germinação, às 60 horas após expostas à germinação em água, apenas o ecótipo AV 503 não havia reduzido sua expressão (Figura 2 E). Assim, salienta-se que a expressão relativa do gene *OsMADS29* não foi constante ao longo do processo de germinação nos genótipos avaliados, que apresentaram picos elevados de expressão em etapas distintas. Cabe ressaltar que os genótipos analisados iniciaram as fases FI, FII, FIII e G em etapas diferentes (Figura 1). Isto sugere que a expressão do gene *OsMADS29* pode estar relacionada a determinadas fases da germinação que influenciam na velocidade desta, nas fases FI, FII, FIII e G. O estudo realizado por Alonso-Blanco et al. (2003) afirma que existe pronunciada variação na velocidade de germinação das sementes, que é resultado da interação entre genes e ambientes específicos. Isto poderia sugerir que a expressão do gene *OsMADS29* está relacionada a etapas específicas da germinação, já que outro estudo, verificou em gel de agarose, que o tempo necessário para percepção inicial da expressão do gene *OsMADS29* correspondeu estreitamente com o tempo necessário para

a emissão da radícula (Li et al., 2011). No presente trabalho a expressão do gene *OsMADS29* mostrou estar relacionada a determinadas etapas da germinação, que influenciam inclusive na velocidade deste processo. Estes resultados mostraram também a relação positiva do gene *OsMADS29* com o processo de germinação em sementes de arroz vermelho.

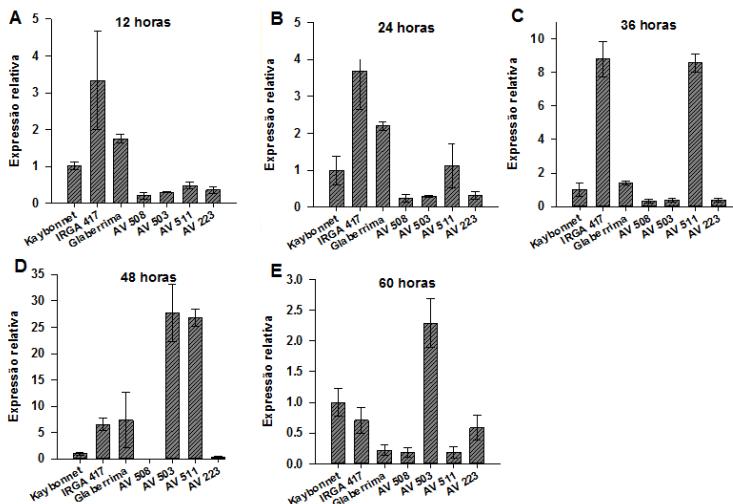


FIGURA 2. Expressão relativa do gene *OsMADS29* em genótipos de arroz, na região do embrião em processo de germinação, às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação (HAG). Médias e desvio padrão apresentados.

CONCLUSÃO

As sementes do gênero *Oryza* apresentam diferenças na velocidade de germinação, mesmo quando na ausência da dormência. As sementes das cultivares testadas mostram maior velocidade de germinação quando comparadas as sementes de arroz vermelho. A expressão do gene *OsMADS29* está relacionada a determinadas etapas da germinação e mostra relação negativa com o caráter de dormência das sementes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO-BLANCO, C., et al. Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. Baltimore, v. 164, n. 2, p. 711-729, 2003.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*. Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.
- FINCH-SAVAGE, W. E. e LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*. Malden, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.
- GOGGIN, D. E., et al. Initial characterisation of low and high seed dormancy. *Plant Physiology*. Rockville, v. 167, n. 15, p. 1282-1288, 2010.
- GRAEBER, K., et al. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environment*. Hoboken, v. 35, n. 10, p. 1769-1786, 2012.
- LI, W., et al. Quantitative trait loci for seed dormancy in rice. *Euphytica*. Wageningen, v. 178, n. 3, p. 427-435, 2011b.
- MIURA, K., et al. Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. New York, 104, n. 6-7, p. 981-986, 2002.