

70. POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO DEGRANE EM GENÓTIPOS DE ARROZ CULTIVADO, VERMELHO E SILVESTRE

Anderson Luis Nunes¹, Aldo Merotto Jr.², Carla a. Delatorre², Ives C.G.R. Goulart¹

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., arroz vermelho, debulha natural.

INTRODUÇÃO

Apesar do arroz vermelho e do arroz cultivado pertencerem a mesma espécie botânica, diferenças relacionadas à cor avermelhada do grão (Sweeney et al., 2006), degrane (Li et al., 2006b) e dormência fisiológica (Finkelstein et al., 2008) das sementes são apresentadas como alguma das características que tornam o arroz vermelho indesejável e que resultam em prejuízos ao arroz cultivado. O arroz vermelho é considerado daninho, principalmente, devido à característica do degrane ou debulha natural que impossibilita a colheita total do produto e resulta no aumento do banco de sementes no solo.

O degrane é uma característica evolutiva e adaptativa para a dispersão e distribuição de sementes em espécies daninhas e silvestres do arroz (Li et al., 2006b). Este caráter contribui na dispersão e distribuição do arroz vermelho através de diversas formas. Primeiramente, o degrane permite que uma parte das sementes produzidas seja distribuída sobre a superfície do solo antes e durante a colheita, evitando que estas sejam removidas do sistema de produção. Em segundo lugar, o principal fluxo de queda das sementes, na maioria dos tipos de arroz vermelho, ocorre alguns dias antes ou no momento que ocorre a maturação fisiológica das sementes (Delouche et al., 2007).

A debulha natural no arroz é controlada por múltiplos genes ou QTLs. Usando cruzamentos entre *O. sativa* spp. *indica* e *O. rufipogon* (espécie silvestre e perene) detectou-se quatro (Cai & Morishima, 2000) e cinco (Konishi et al., 2006) QTLs associados à debulha natural. Análises genéticas de uma população F₂ proveniente do cruzamento entre *Oryza sativa* ssp. *indica* e *O. nivara* (espécie silvestre e anual) identificaram três QTLs (*sh3*, *sh4* e *sh8*) responsáveis pela redução da debulha natural de grãos no arroz cultivado (Li et al., 2006a). Neste estudo, verificou-se que o QTL *sh4* localizado no cromossomo 4 é dominante e explica 69% da variância fenotípica. Já os QTLs *sh3* e *sh8* explicam apenas 6,0 e 3,1%, respectivamente. Entretanto, analisando geneticamente uma população F₂ oriunda do cruzamento entre *O. sativa* spp. *indica* e *O. sativa* spp. *japonica* detectou-se cinco QTLs, sendo que, o alelo *sh1* presente no cromossomo 1 explica 69% da variância fenotípica (Konishi et al., 2006).

O arroz é a planta cultivada mais conhecida em nível genômico. Com as informações provenientes do sequenciamento é possível entender alguns processos importantes como a especiação, domesticação, ploidização e adaptação ecológica. Associando o sequenciamento do arroz com a variabilidade genética do gênero *Oryza* é possível entender o comportamento de caracteres que tornam as plantas de arroz vermelho daninhas, como por exemplo, o degrane das sementes. Com melhor compreensão destes caracteres será possível determinar práticas de manejo que permitam reduzir os problemas da principal planta daninha do sistema orizícola do Brasil. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar fenotipicamente genótipos de arroz em relação ao degrane e verificar nestes genótipos a sequência nucleotídica de parte dos genes *SH1* e *SH4*.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram fenotipados 15 cultivares de arroz, 15 ecótipos de arroz vermelho e duas espécies silvestres quanto ao nível de degrane. As sementes destes genótipos foram fornecidas pelo IRGA, EPAGRI, EMBRAPA/CNPAP e RICETEC. A semeadura foi realizada em tanques de concreto contendo solo hidromórfico classificado como gleissolo. Foram semeadas linhas de 30 cm para cada população, com densidade de 50 sementes por metro linear. No período de maturação foi avaliada a resistência à tensão de ruptura (RTR) em quatro grãos do terço superior, mediano e inferior de quatro

¹ Estudante de pós-graduação em Fitotecnia. UFRGS. Faculdade de Agronomia. Av. Bento Gonçalves, 7712. Cx. P. 15100. Cep 91501-970. Porto Alegre, RS.

² Professor Adjunto. Faculdade de Agronomia. UFRGS. Porto Alegre, RS. E-mail: merotto@ufrgs.br

panículas por população, totalizando 16 repetições por população. Foi considerada planta madura a que apresentava sementes resistentes à pressão da unha, com aproximadamente 23% de umidade. A determinação da RTR foi realizada por meio de pesos com massa conhecida que eram inseridos em um gancho que envolvia o grão de arroz até o desprendimento do grão do pecíolo. Posteriormente, foi extraído o DNA de algumas populações anteriormente fenotipadas baseado no protocolo de Doyle & Doyle (1990). Com auxílio do programa *Primer3*, sequências nucleotídicas iniciadoras (*primers*) foram desenhadas para amplificação de regiões de aproximadamente 500 kb. O desenho das sequências nucleotídicas iniciadoras foi baseado no alinhamento de sequências nucleotídicas dos genes *SH1* e *SH4*, relacionados ao degrane disponíveis no GenBank. As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram realizadas com a programação para um passo inicial de 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C. Cada reação utilizou 20 ng de DNA, 10 µM de cada seqüência nucleotídica iniciadora (*forward* e *reverse*), 10 mM deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 5 unidades de DNA polimerase, 10 µL de tampão (10x), e 50 mM de cloreto de magnésio, em um volume final de 100 µL por reação. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, submetido a uma tensão elétrica de 110 V por 2 h, em tampão TBE, 0,5 X. Os géis foram visualizados em transluminador UV. O tamanho dos fragmentos foi determinado com a utilização do programa Kodak EDAS 290 (*Electrophoresis Documentation and Analysis System*) comparando com o padrão DNA *ladder* 100 bp.

Os fragmentos da reação de PCR foram sequenciados usando o produto da reação de PCR (15 ng), seqüências nucleotídicas iniciadoras *forward* e *reverse* (1,7 µM), kit para sequenciamento BigDye 3.1 (1 µL) (Applied Biosystems) e tampão BigDye 3.1 (0.5X) (Applied Biosystems) em um volume total de 5 µL. O produto obtido foi precipitado usando acetato de etanol/sódio. O fragmento de DNA resultante foi ressuscitado em 10 µL de formamida, mantido em gelo durante 5 minutos e desnaturado durante 5 minutos à 95 °C. A análise foi realizada no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Ambas as fitas de DNA amplificadas foram sequenciadas usando seqüências nucleotídicas iniciadoras *forward* e *reverse* individualmente. As seqüências foram editadas e alinhadas usando o programa BioEdit v7.0.9 (Ibis Therapeutics). As seqüências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as seqüência dos alelos *sh1* e *sh4* de forma a identificar os SNP entre estas. A presença dos SNPs descritos por Konishi et al. (2006) e Li et al. (2006) indicam a origem da ausência de debulha em genótipos de arroz cultivado. Dessa forma, foi possível relacionar a análise fenotípica do degrane (RTR) com a composição nucleotídica dos genes relacionados a esta característica em arroz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da RTR individualizada por terço da panícula indicou que somente três ecótipos apresentam diferente degrane em relação a diferentes partes da panícula. Nos ecótipos de arroz vermelho AV 04A e AV 144 a RTR no terço inferior foi maior que nos terços superior e mediano (Figura 1A). Já para o ecótipo de arroz cultivado Lacassine a RTR foi menor no terço inferior quando comparado com os terços superior e mediano. Os resultados da RTR, considerando a panícula como um todo, mostram a formação de três grupos distintos (Figura 1B). Quanto maior a RTR menor é o nível de degrane do ecótipo. No primeiro grupo que compreende do ecótipo silvestre *Oryza glumaepatula* até o ecótipo de arroz vermelho AV 144 a RTR foi de até 70 gf. Este grupo é o que apresenta maior nível de degrane e é composto inteiramente por ecótipos de arroz vermelho, com exceção do ecótipo silvestre de *O. glumaepatula*. Já no segundo grupo que compreende do ecótipo IRGA 417 até a cultivar Kaybonnet a RTR variou entre 77 e 115 gf. Neste grupo o degrane foi moderado e é composto por dois ecótipos de arroz vermelho além das variedades de arroz cultivado. No terceiro grupo estão presentes os materiais com RTR acima de 128 gf que compreende desde *Oryza glaberrima* até a cultivar Nipponbare.

Os resultados acima evidenciam que os ecótipos de arroz vermelho utilizam o degrane como uma das principais formas de dispersão das sementes e perpetuação da espécie. Além disso, os ecótipos de arroz vermelho apresentam pouca variabilidade fenotípica com relação ao degrane. Recentemente, Schwanke et al. (2008) verificaram que ecótipos de arroz vermelho provenientes de lavouras de arroz irrigado também foram pouco variáveis em relação ao degrane das suas sementes na fase da maturação. Dos 16 ecótipos avaliados neste trabalho, 11 apresentaram fácil degrane, quatro foram de degrane

intermediário e apenas um ecótipo apresentou difícil degrane. Neste estudo as cultivares BR-IRGA 409 e 410 e El Paso L 144 foram classificadas como de degrane intermediário, e IRGA 417 de difícil degrane. Com relação ao comportamento do degrane nas espécies de arroz silvestre fica evidente que *O. glaberrima* se encontra em elevado processo de domesticação. Apesar desta espécie ser considerada silvestre, a mesma é cultivada na África e em alguns locais do Brasil.

Com o objetivo de encontrar as origens da variabilidade do degrane demonstrada acima, estudos de isolamento e sequenciamento dos genes presentemente descritos como relacionados a este processo estão sendo conduzidos. Até o momento, parte dos dois principais genes relacionados ao degrane no arroz foram sequenciadas em alguns genótipos do trabalho anterior (Figura 2). No gene *SH1* foi encontrado um polimorfismo nucleotídico simples (SNP) nos ecótipos seqüenciados. Nos ecótipos cultivados, com exceção de Lacassine, encontrou-se a base citosina e no ecótipo de arroz vermelho AV 223 a base adenina. Essa mutação confere a troca na seqüência de aminoácidos de Cisteína para Alanina. Konishi et al. (2006) verificou que a substituição do nucleotídeo Guanina por Timina no gene *SH1* nesta posição resulta na redução no degrane do arroz. Já no gene *SH4* a base adenina foi encontrada na cultivar Wells e a base citosina nos ecótipos de arroz vermelho ITJ 11 e AV 144. Essa mutação confere a troca na seqüência de aminoácidos de Alanina por Ácido Glutâmico. Li et al., 2006 verificou que a substituição do nucleotídeo Guanina por Timina nesta posição resultou na substituição do aminoácido asparagina por lisina e na redução do degrane no arroz. Em um primeiro momento os SNPs encontrados neste trabalho não são os mesmos reportados por Konishi et al. (2006) e Li et al., (2006b), pois a substituição nucleotídica e do aminoácido não são as mesmas.

CONCLUSÃO

Existe grande variabilidade fenotípica do degrane entre os genótipos de arroz vermelho, arroz cultivado e outras espécies silvestres do gênero *Oryza*. Os ecótipos de arroz vermelho apresentam baixa variabilidade fenotípica quanto ao degrane. No gene *SH1* tem um polimorfismo de nucleotídeo único que confere a troca na seqüência de aminoácidos de cisteína para alanina. Já no gene *SH4* o polimorfismo de nucleotídeo único é trocado na seqüência de aminoácidos de alanina por ácido glutâmico.

AGRADECIMENTOS

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), à Embrapa Arroz e Feijão e à Ricetec pelo fornecimento das sementes. A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAI, H.W.; MORISHIMA, H. Genomic regions affecting seed shattering and seed dormancy in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.840-846, 2000.
- DELOUCHE, J.C.; BURGOS, N.R.; GEALY, D.R.; de SAN MARTIN, G.Z.; LABRADA, R.; LARINDE, M.; FINKELSTEIN, R.; REEVES, W.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.387-415, 2008.
- KONISHI, S.; IZAWA, T.; LIN, S.Y.; EBANA, K.; FUKUTA, Y.; SASAKI, T.; YANO, M. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. **Science**, v.312, p.1392-1396, 2006
- LI, C.B.; ZHOU, A.L.; SANG, T. Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. **New Phytologist**, v.170, p.185-193, 2006a.
- LI, C.B.; ZHOU, A.L.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, v.311, p.1936-1939, 2006b.
- SCHWANKE, A.M.L.; NOLDIN, J.A.; ANDRES, A.; PROCÓPIO, S.O.; CONCENÇO, G. Caracterização morfológica de ecótipos de arroz daninho (*Oryza sativa*) provenientes de áreas de arroz irrigado. **Planta Daninha**, v.26, p.249-260, 2008.
- SWEENEY, M.T.; THOMSON, M.J.; PFEIL, B.E.; MCCOUCH, S. Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **Plant Cell**, v.18, p.283-294, 2006.

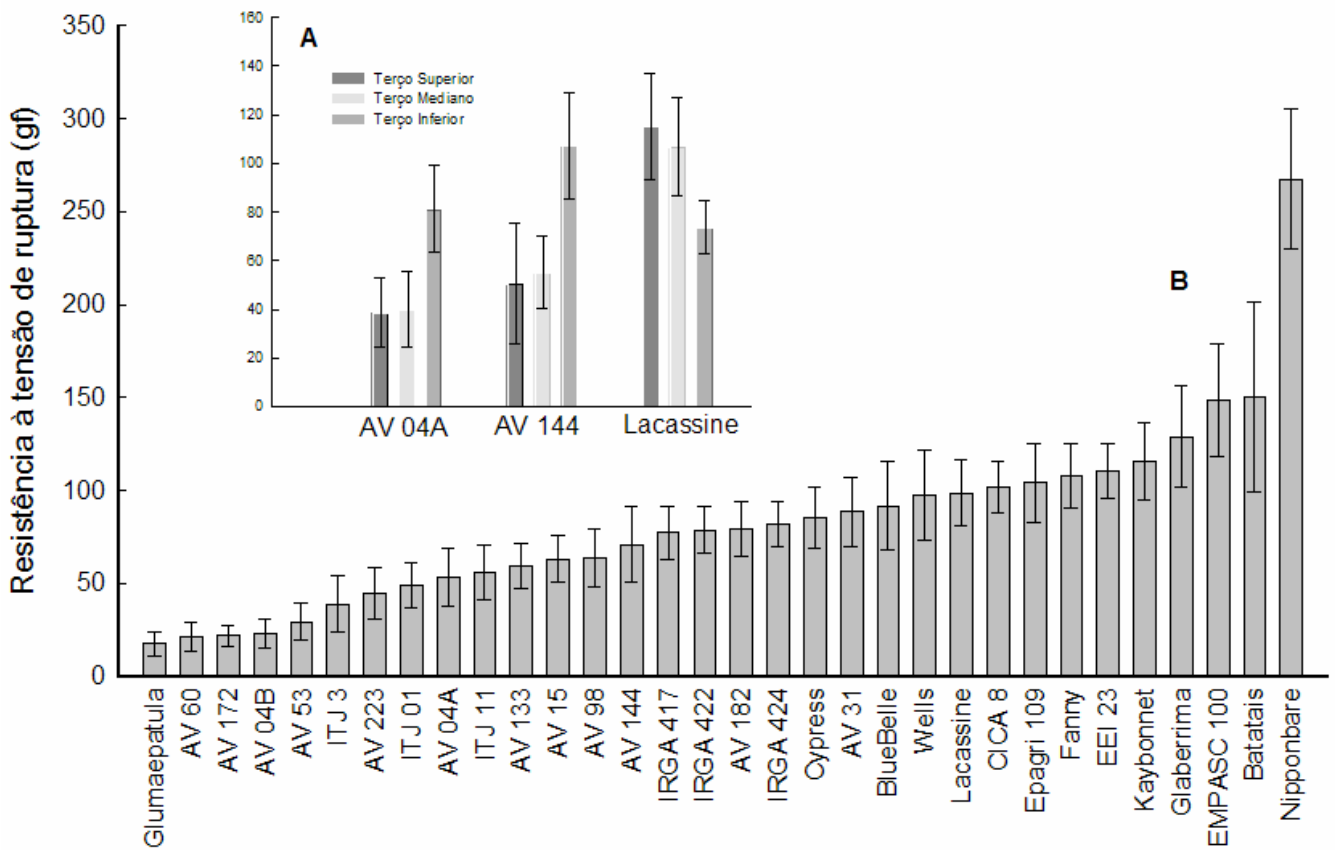


Figura 1. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo no momento da maturação. A) RTR dos ecótipos que apresentaram diferenças dentro da panícula. B) RTR dos ecótipos avaliados na média dos três terços.

SH1

<i>O. sativa</i> (GB)	TTAGCACAGTCACGTTTGTGCTGCAGTTGCTTCCTCGCTTTGTCACGCAGGCC
Blue Belle	TTAGCACAGTCACGTTTGTGCTGCAGTTGCTTCCTCGCTTTGTCACGCAGGCC
Empasc 100	TTAGCACAGTCACGTTTGTGCTGCAGTTGCTTCCTCGCTTTGTCACGCAGGCC
Wells	TTAGCACAGTCACGTTTGTGCTGCAGTTGCTTCCTCGCTTTGTCACGCAGGCC
Lacassine	TTAGCACAGTCACGTTTGTGATGCAGTTGCTTCCTCGCTTTGTCACGCAGGCC
AV 223	TTAGCACAGTCACGTTTGTGATGCAGTTGCTTCCTCGCTTTGTCACGCAGGCC

SH4

<i>O. rufipogon</i> (GB)	GTAGCAGTATCTAGTATGGCGTGGCAGGCCGGTGCAGATAAAAAGGGCCCCGGGTTTTG
ITJ 11	GTAGCAGTATCTAGTATGGCGTGGCAGGCCGGTGCAGATAAAAAGGGCCCCGGGTTTTG
AV 144	GTAGCAGTATCTAGTATGGCGTGGCAGGCCGGTGCAGATAAAAAGGGCCCCGGGTTTTG
Wells	GTAGCAGTATCTAGTATGGAGTGGCAGGCCGGTGCAGATAAAAAGGGCCCCGGGTTTTG

Figura 2. Alinhamento das seqüências nucleotídicas de parte dos genes *SH1* e *SH4* dos genótipos de arroz cultivado e arroz vermelho. GB = seqüência obtida Gene Bank.