

# **EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DA PAREDE CELULAR E SUA RELAÇÃO COM O DEGRANE EM ARROZ VERMELHO**

Catarine Markus<sup>1</sup>; Aldo Merotto Júnior<sup>2</sup>; José Ari Nenê Barcelos<sup>3</sup>; Giliardi Dalazen<sup>4</sup>

Palavras-chave: debulha natural, arroz daninho, real time, OsCel9D, OsXTH8.

## **INTRODUÇÃO**

A suscetibilidade à debulha natural, ou degrane, é resultante da presença de uma camada de abscisão formada por pequenas células com parede celular fina entre o grão de arroz e o pedicelo (Li et al., 2006). Nas plantas que apresentam alto degrane, como o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.), esta camada é contínua em toda a zona de abscisão e possibilita que o principal fluxo de queda das sementes ocorra poucos dias antes ou no momento da maturação fisiológica das mesmas. Esta característica é fundamental para perpetuação do arroz vermelho, pois na ausência do caráter degrane as sementes poderiam ser colhidas e retiradas do sistema de produção, o que diminuiria sua infestação na lavoura. Assim, para o desenvolvimento de estratégias de controle do arroz vermelho em longo prazo, é fundamental o desenvolvimento de tecnologias que reduzam a debulha natural desta planta daninha.

Numerosos genes parecem estar envolvidos na diferenciação das células da camada de abscisão. Destes, apenas três genes já tiveram sua ação sobre o degrane comprovada, *qSH1*, *Sh4* e *OsCPL1*, entretanto, resultados distintos relacionados a estes genes já foram encontrados. Isto mostra a complexidade do processo. A ruptura da semente da planta mãe ocorre quando enzimas hidrolíticas, como poligalacturonase e β-endo-glucanase, respondem a certos sinais e são ativadas nas células da camada de abscisão, causando a degradação da lamela média e da parede celular, que resultam na queda do grão (Roberts et al., 2002). Isto indica que genes relacionados a parede celular podem apresentar importância para o processo de degrane. Enzimas codificadas pelos genes *OsCel9D* e *OsXTH8* estão relacionadas à quebra de ligações químicas que permitem desde uma nova conformação da parede celular até a degradação da mesma (Roberts et al., 2002). Conforme as informações abordadas acima, os genes *OsCel9D* e *OsXTH8* podem estar relacionados ao caráter degrane em *O. sativa*, o entendimento da expressão de genes relacionados à debulha natural permite conhecer melhor os mecanismos envolvidos neste processo e, assim, desenvolver formas eficientes de reduzir a presença do arroz vermelho nas lavouras orizícolas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a expressão dos genes *OsCel9D* e *OsXTH8* com relação ao degrane em populações de arroz contrastantes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi dividido em duas etapas principais, a primeira consistiu na fenotipagem dos genótipos de arroz e a segunda no estudo da expressão dos genes *OsCel9D* e *OsXTH8*. A fenotipagem dos genótipos quanto ao nível de degrane foi realizada através da determinação da “Resistência à Tensão de Ruptura” (RTR) do grão no pecíolo. As informações dos genótipos de arroz utilizados são apresentados na Tabela 1. O

<sup>1</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>, 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, Acadêmico da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Doutorando Depto Plantas de Lavoura, UFRGS.

experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. O nível de degrane foi avaliado em quatro panículas por genótipos e cinco grãos da parte mediana de cada panícula. As análises foram realizadas quando as plantas apresentavam mais de dois terços de suas panículas totalmente dobradas e suas sementes resistentes à pressão da unha. A RTR foi determinada através de um medidor de força digital (Digital Force Gauge – DART 2.0, SHIMPO), que registra a força em gramas. Quanto maior o valor da RTR, menor o nível de degrane do grão. Os dados foram analisados através da análise da variância, quando significativo, aplicou-se o teste Tukey ( $p<0,05$ ) para comparação entre médias, através do programa SAS 9.0.

TABELA 1. Denominação e classificação dos genótipos de arroz analisados no estudo de degrane.

Genótipos utilizados				
Arroz cultivado		Arroz vermelho (AV)		Arroz silvestre/cultivado
Cica 08	Epagri109	AV 04	AV 172	<i>Oryza glaberrima</i>
Batatais	IRGA 417	AV 31	AV 503	
EEI 23	Lacassine	AV 53		
EEI 31	Nipponbare	AV 60		
Empasc100		AV 109		

O estudo da expressão gênica foi realizado com base no material vegetal coletado de aproximadamente 1 mm da região do pedicelo e de 1,5 mm da região da flor. No dia em que ocorreu a antese na parte mediana da panícula, a mesma era marcada e dez dias após foi realizada a coleta do material, que era imediatamente depositado em nitrogênio líquido ( $\text{LN}_2$ ). Cada genótipo contou com três repetições, sendo que uma repetição foi composta de 30 junções da região pedicelo-flor, equivalente a 30 mg de material vegetal. 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. A expressão relativa foi analisada 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. Os dados foram analisados através da análise da variância, quando significativo, aplicou-se o teste Tukey ( $p<0,05$ ) para comparação entre médias, através do programa SAS 9.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fenotipagem, realizada através da análise da RTR, mostrou que houve variação significativa quanto ao nível de degrane entre os genótipos avaliados (Figura 1). Os ecótipos de arroz vermelho necessitaram de menor força (gf) para desprender o grão da panícula e desta forma, apresentaram maior nível de degrane. Dentre os ecótipos de arroz vermelho, AV 503 apresentou o menor nível de degrane, necessitando de aproximadamente 50 gf para desprender o grão da panícula (Figura 1). As cultivares Lacassine, IRGA 417 e Epagri 109 apresentaram degrane moderado, com RTR próxima a 80 gf (Figura 1). A espécie silvestre *O. glaberrima* e as cultivares EEI 23, Batatais, EEI 31, Cica 8, EMPASC 100 e Nipponbare apresentaram baixo nível de degrane, a RTR destes genótipos foi superior a 111 gf (Figura 1). Outro trabalho que avaliou o degrane em 241 acessos de arroz vermelho e 125 cultivares de arroz, provindos de mais de 12 países diferentes, verificou que todas as cultivares analisadas apresentaram baixo degrane, enquanto que todos os acessos de arroz vermelho mostraram alto nível de degrane (Zhu et al., 2012). Estas informações, juntamente com os dados obtidos no presente estudo, evidenciam que grande parte dos ecótipos de arroz vermelho utiliza o degrane como forma de dispersão das sementes e perpetuação da espécie.

A análise da expressão gênica demonstrou que os genes *OsCes19D* e *OsXTH8*

apresentaram expressão na região entre o pedicelo e a flor (Figura 2A e B). Com relação ao gene *OsCel9D*, verificou-se que os ecótipos de arroz vermelho apresentaram menor expressão relativa deste gene, quando comparado as cultivares analisadas (Figura 2A), isto indica que o gene *OsCel9D* apresenta relação com a repressão do processo de abscisão. Nas cultivares de arroz a expressão relativa foi de seis a 23 vezes superior ao ecótipo AV 60 que apresenta alto degrane (Figura 2A). Outro trabalho obteve resultado semelhante, quando a expressão relativa do gene *OsCel9D* nas cultivares de arroz Lacassine e Batatais foi de cinco e 30 vezes superior ao ecótipo AV 60, respectivamente (Nunes, 2012). O gene *OsCel9D* codifica uma proteína do tipo endo-1,4-beta-glucanase (Yoshida et al., 2006). A família a qual esta proteína pertence possui papel importante nos processos de crescimento e desenvolvimento em plantas de arroz. 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, o que justifica seu envolvimento com a repressão do caráter degrane.

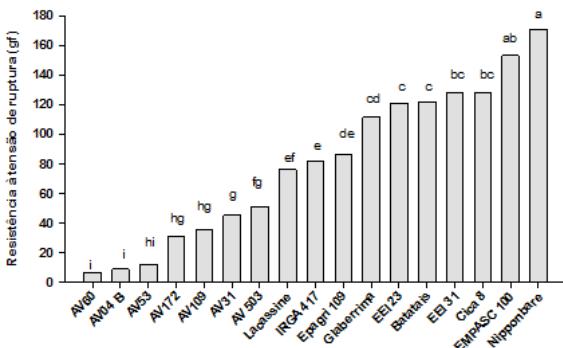


FIGURA 1. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo, no momento da maturação fisiológica das sementes, nos genótipos de arroz avaliados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A expressão do gene *OsXTH8* foi relacionada com o caráter de degrane das sementes. O presente estudo verificou, apenas com exceção do ecótipo AV 60, que o padrão de expressão do gene *OsXTH8* mostrou relação direta com a presença do degrane, já que os maiores níveis de expressão relativa do gene foram verificados nos ecótipos de arroz vermelho (Figura 2B). Resultados obtidos por Nunes (2012) também mostraram envolvimento do gene *OsXTH8* com o caráter de degrane. As cultivares de arroz Batatais e Lacassine que apresentam baixo nível de degrane, apresentaram expressão relativa inferior ao controle AV 60, que possui alto degrane. Já os ecótipos de arroz vermelho analisados, AV 31 e AV 60, apresentaram expressão relativa semelhante (Nunes, 2012). O gene *OsXTH8* codifica a enzima *xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase*, que catalisa a clivagem de polímeros de xiloglucana. Ainda, estas enzimas afrouxam a parede celular para a expansão celular regulada pelo turgor (Rose et al., 2002). O gene *OsXTH8* é expresso em elevados níveis em células que estão ativamente em processo de alongamento e diferenciação (Jan et al., 2004).

Durante o processo de abscisão, a expressão do gene *OsXTH8* pode facilitar a queda natural do grão através da clivagem de polímeros da parede celular, permitindo que as células da camada de abscisão separem-se com o menor esforço possível. Dessa forma, mudanças nos componentes da parede celular, através do maior nível de expressão de determinados genes, pode culminar em alterações no processo de abscisão. Como a expressão do gene *OsCel9D* parece 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, possibilitaria até eliminar os problemas causados pelas plantas de arroz vermelho nas lavouras de arroz irrigado em vários locais do mundo.

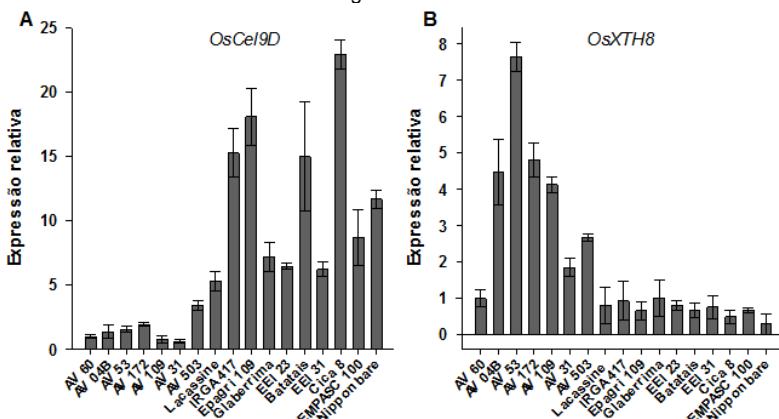


FIGURA 2. Expressão relativa dos genes *OsCe19D* (A) e *OsXTH8* (B) nos genótipos de arroz, aos dez dias após a polinização. Médias e desvio padrão apresentados.

## CONCLUSÃO

Os ecótipos de arroz vermelho apresentam alto nível de degrane com pouca variabilidade entre os materiais avaliados. Entretanto, a variabilidade fenotípica do degrane aumenta quando é considerado a presença das cultivares de arroz. Os genes *OsXTH8* e *OsCe19D* apresentam relação com a ativação e com a repressão desta característica em arroz vermelho, respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LI, C. B., ZHOU, A. L. e SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, Michigan, v. 311, n. 5769, p. 1936-1939, 2006.
- NUNES, A. L., **Variabilidade genética de características associadas ao degrane em arroz vermelho**. 2012. 128f. Tese (Doutorado em Herbologia)—Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- 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**. Oxford, 61, n. 1, Jan, p. 96-106, 2010.
- JAN, A., et al. Characterization of xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. **Physiology Plant**. Rockville, v. 136, n. 3, p. 3670-3681, 2004.
- 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**. Waltham, v. 60, n. 1, p. 137-151, 2006.
- ROBERTS, J. A., ELLIOTT, K. A. e GONZALEZ-CARRANZA, Z. H. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n., p. 131-158, 2002.
- ROSE, J. K. C. et al. The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: **Plant and Cell Physiology**. Oxford, v. 43, n. 12, p. 1421-1435, 2002.
- ZHU, Y. Q., ELLSTRAND, N. C. e LU, B. R. Sequence polymorphisms in wild, weedy, and cultivated rice suggest seed-shattering locus *Sh4* played a minor role in Asian rice domestication. **Ecology & Evolution**. London, v. 2, n. 9, p. 2106-2113, 2012.