

IMPORTÂNCIA DO GENE *Sh4* PARA O CARÁTER DE DEGRANE EM ARROZ VERMELHO E PARA O PROCESSO DE DOMESTICAÇÃO EM ARROZ CULTIVADO

Catarine Markus¹; Aldo Merotto Júnior²; Anderson Luis Nunes³; Giliardi Dalazen⁴

Palavras-chave: debulha natural, arroz daninho, camada abscisão e expressão gênica.

INTRODUÇÃO

A debulha natural, ou degrane, ocasiona a deposição de sementes de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) sob a superfície do solo, antes e durante a colheita. Isto dificulta a remoção desta espécie das lavouras orizícolas e contribui para que o arroz vermelho seja a principal planta daninha da cultura do arroz irrigado. O degrane é resultante da presença de camada de abscisão existente entre o grão e o pedicelo, formada por células com parede celular fina, que são degradadas e promovem a ruptura da semente da planta mãe.

O estudo realizado por Li et al. (2006) verificou que a mutação G₂₃₇T no exon um do gene *Sh4*, ocasionou a substituição do aminoácido asparagina por lisina, que foi relatado como responsável pelo desenvolvimento incompleto da camada de abscisão e origem da ausência de debulha no arroz cultivado. Após esta descoberta, acreditou-se na simplicidade do mecanismo de degrane, o que gerou novas perspectivas com relação à possibilidade do controle do arroz vermelho. Neste caso, se a característica de interesse fosse governada por um gene principal, e este fator fosse passível de manipulação, seria possível mudar o genótipo, alterando o comportamento do degrane. Contudo, resultados distintos quanto a importância do gene *Sh4* foram encontrados em trabalhos realizados por Akasaka et al. (2011) e Zhu et al. (2012). Estes fatos ressaltam a importância de estudos com genótipos de arroz vermelho e cultivado provindos do Rio Grande do Sul, para possibilitar o melhor entendimento do caráter degrane nos genótipos aqui existentes e, desta forma, elaborar formas eficientes de reduzir a presença do arroz vermelho nas lavouras de arroz irrigado. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar a expressão do gene *Sh4* em populações contrastantes de *O. sativa*, verificar a existência mutação G₂₃₇T no exon um do gene *Sh4* e analisar sua possível relação com o caráter degrane e processos de domesticação do arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre/RS. O estudo foi dividido em duas etapas principais, a primeira está relacionada à fenotipagem dos genótipos utilizados e a segunda ao estudo de expressão e variabilidade nucleotídica do gene *Sh4*.

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. Foram utilizados os ecótipos de arroz vermelho AV 31, AV 53 e AV 60, as cultivares Cica 8, IRGA 417 e Nipponbare, e a espécie silvestre *O. glaberrima*. O 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

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

² Eng. Agr., PhD, UFRGS.

³ Eng. Agr., Dr. IFRS – Campus Sertão.

⁴ Eng. Agr., Doutorando Depto Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

panícula. As análises foram realizadas quando as plantas encontravam-se no início da maturação dos grãos. Foi considerada planta madura aquela que apresentava visualmente mais de dois terços de suas panículas totalmente dobradas e suas sementes resistentes à pressão da unha. A RTR foi determinada por meio de um medidor de força digital (Modelo FGV-Digital Force Gauge – DART 2.0, SHIMPO). Um gancho foi conectado ao aparelho, de forma a envolver o grão de arroz. Após, foi realizado o tensionamento do aparelho no sentido vertical até que o grão fosse desprendido da panícula. O equipamento registra a força em gramas que correspondente a RTR. 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 (SAS Institute, 2004).

A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica RT-PCR em tempo real. Os genótipos utilizados foram os mesmos citados para a análise fenotípica. Panículas polinizadas naturalmente, no mesmo dia e hora, foram coletadas aos dez dias após a antese e conduzidas ao laboratório. Neste momento, foram coletadas 30 junções pediceloflor do terço médio da panícula (30 mg de material vegetal) por repetição. O material foi imediatamente depositado em nitrogênio líquido (LN_2) e consistiu de 1 mm da região do pedicelo e de 1,5 mm da região da flor. Cada genótipo contou com três repetições. 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 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{alvo}} - \text{Ct}_{28S}) - (\text{Ct}_{\text{calibrador}} - \text{Ct}_{28S})$, sendo o $\Delta\Delta\text{Ct}$ a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em $2^{(\Delta\Delta\text{Ct})}$ 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 (SAS Institute, 2004).

A análise da variação nucleotídica do gene *Sh4* foi realizada no ecótipo AV 60, nas cultivares Cica 8 e Nipponbare, e na espécie silvestre *O. glaberrima*. As amostras de DNA genômico foram obtidas de aproximadamente 150 mg de tecido foliar jovem, dos quatro genótipos citados acima. O DNA genômico foi extraído através do protocolo CTAB (brometo de cetyltrimetilâmônio) modificado (Doyle & Doyle, 1987). A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em termociclador PTC100® (MJ Research). O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre/RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer® que possui capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas pelo programa BioEdit (versão 7.0.5.3). Após, foram alinhadas através do ClustalW, e o alinhamento foi realizado com a ferramenta BLASTn, com base na sequência AL606619 do gene *Sh4*, previamente depositada nos banco de dados GenBank e Gramene.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da RTR dos grãos da parte mediana da panícula mostrou que houve variação significativa entre os genótipos avaliados. A menor força necessária para desprender o grão da panícula foi apresentada por ecótipos de arroz vermelho (Figura 1A). Dentre estes, AV 60 apresentou o maior nível de degrane, necessitando de força inferior a 10 gf. Os ecótipos AV 53 e AV 31 também apresentaram alto degrane e por isso baixa RTR, 13 e 46 gf, respectivamente (Figura 1A). A cultivar IRGA 417 mostrou degrane moderado, no entanto, a força necessária para desprender o grão da panícula foi praticamente o dobro do ecótipo de arroz vermelho com menor degrane. A espécie silvestre *O. glaberrima* e as cultivares Cica 8 e Nipponbare apresentaram baixo degrane, pois necessitaram de RTR superior a 110 gf (Figura 1A).

Através dos dados apresentados evidencia-se que os ecótipos de arroz vermelho

utilizam o degrane como forma de dispersão das sementes e perpetuação da espécie. Além disso, os ecótipos de arroz vermelho apresentam pouca variabilidade fenotípica com relação ao degrane. A intensidade do degrane diminui quando consideramos as cultivares de arroz. Isto ocorre devido ao processo de domesticação do arroz que está diretamente relacionado à redução do degrane das sementes desta cultura (Zhang et al., 2009). Outro trabalho também verificou importância do caráter degrane para ecótipos de arroz vermelho provindos do sul do Brasil, onde dos 16 ecótipos avaliados, 11 apresentaram fácil degrane, quatro foram de degrane intermediário e apenas um ecótipo apresentou difícil degrane. No mesmo trabalho, as cultivares BR-IRGA 409 e 410 e El Paso L 144 foram classificados com nível de degrane intermediário, e IRGA 417 de difícil degrane (Schwanke et al., 2008).

O gene *Sh4* apresentou expressão na região entre o pedicelo e a flor, aos dez dias após a polinização. Entretanto sua expressão relativa não mostrou relação direta com nível de degrane, pois fenótipos contrastantes apresentaram nível de expressão semelhante (Figura 1B). Os genótipos AV 53, *O. glaberrima* e Nipponbare que diferiram estatisticamente quanto ao nível de degrane (Figura 1A), não apresentaram diferença estatística quanto a expressão relativa do gene *Sh4* (Figura 1B). Ainda, contrariamente ao esperado, os maiores níveis de expressão foram verificados nas cultivares Cica 8 e IRGA 417. Isto indica que a expressão do gene *Sh4* nesta região, não está relacionada com a formação da camada de abscisão nos genótipos testados.

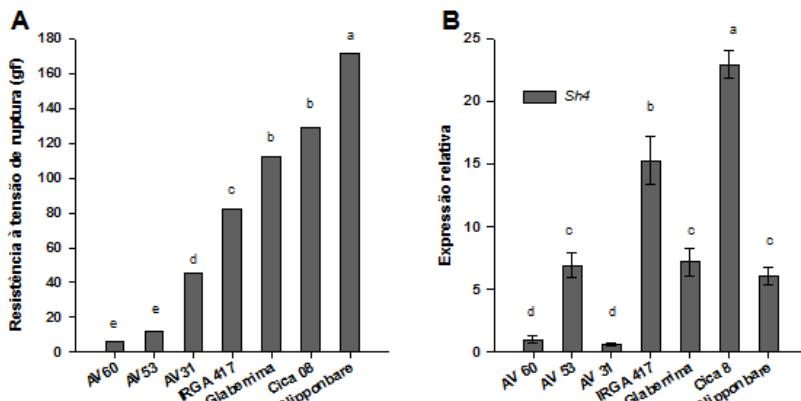


FIGURA 1. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo, no momento da maturação fisiológica das sementes dos genótipos de arroz avaliados (A). Expressão relativa do gene *Sh4* em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*, aos dez dias após a polinização (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados do sequenciamento do gene *Sh4* mostraram ausência da mutação $G_{237}T$ (Figura 2). Isto intensifica a existência de resultados distintos daqueles encontrados por Li et al. (2006). Em genótipos provindos da cidade de Okayama, no Japão, também não foi verificada relação da expressão do gene *Sh4* com o caráter de degrane (Akasaka et al., 2011). Outro estudo que avaliou acessos de arroz silvestre, arroz daninho e cultivares de arroz, oriundos de regiões da Ásia, sul da Europa e América do Norte verificou que 73,5% dos acessos de arroz silvestre continham o nucleotídeo G na região do exon um. Enquanto que uma minoria significativa, 26,5% dos acessos silvestres, apresentavam a mutação $G_{237}T$ no gene *Sh4* e 100% dos acessos de arroz daninho analisados continham, o nucleotídeo T e apresentaram degrane (Zhu et al., 2012). Assim, tanto o presente estudo, como os trabalhos desenvolvidos por Akasaka et al., (2011) e Zhu et al., (2012) diferiram

dos resultados obtidos por Li et al. (2006), pois os genótipos testados não apresentam envolvimento do gene *Sh4* nos processos de degrane e domesticação do arroz.

Modelo	CCCCAACGCCGGCGCGCGTCTGCTCCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGGGCT	240
AV60	CCCCAACGCCGGCGCGCGTCTGCTCCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGGGCT	124
Nipponbare	CCCCAACGCCGGCGCGCGTCTGCTCCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGGGCT	122
O.glaberrima	CCCCAACGCCGGCGCGCGTCTGCTCCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGGGCT	113
Cica 8	CCCCAACGCCGGCGCGCGTCTGCTCCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGGGCT	84

FIGURA 2. Alinhamento parcial das sequências do exon um do gene *Sh4*, em quatro genótipos de arroz, com base na sequência modelo AL606619 (*GenBank*). Fita senso.

A hipótese apresentada por Zhu et al., (2012) aborda que a diminuição do caráter de degrane devido à presença do nucleotídeo T pode ocorrer apenas em alguns genótipos que possuem características favoráveis a este evento, ou ainda, que haja a presença de outros *loci* que foram previamente selecionados durante o processo de domesticação. Isto indica que processos distintos de domesticação possam ter ocorrido e explica porque genótipos originados de lugares diferentes apresentam regulação distinta para o caráter de degrane.

CONCLUSÃO

O gene *Sh4* não apresenta importância para o processo de degrane no arroz vermelho oriundo da região do sul do Brasil, assim como não está envolvido nos processos de domesticação das cultivares testadas. Este resultado é distinto dos resultados já encontrados em arroz cultivado, onde este gene foi apontado como de grande importância para o degrane das sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKASAKA, M., et al. Histological and genetic characteristics associated with the seed-shattering habit of weedy rice (*Oryza sativa* L.) from Okayama, Japan. **Breeding Science**. Tokyo, v. 61, n. 2, p. 168-173, 2011.
- DOYLE, J. J.e DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. Oklahoma, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- LI, C. B., ZHOU, A. L. e SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, Michigan, v. 311, n. 5769, p. 1936-1939, 2006.
- SAS INSTITUTE INC. **Base SAS® 9.1 Procedures Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.
- SCHWANKE, A. M. L., et al. Morphological characterization of red rice (*Oryza sativa*) ecotypes derived from irrigated rice areas. **Planta Daninha**. Viçosa, v. 26, n. 2, p. 249-260, 2008.
- ZHANG, L. B., et al. Selection on grain shattering genes and rates of rice domestication. **New Phytologist**. Malden, v. 184, n. 3, p. 708-720, 2009.
- 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.