

RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *Sdr4* COM O CARÁTER DE DORMÊNCIA EM ARROZ VERMELHO

Cátia Meneguzzi¹, Catarine Markus², Aldo Merotto Júnior³, Valmir Kupas⁴

Palavras-chave: arroz daninho, sementes dormentes, germinação e real time.

INTRODUÇÃO

A elevada dormência das sementes possibilita que as mesmas persistam no solo por longo período, antes de iniciar a germinação. Através desta adaptação, o momento da germinação pode evitar climas desfavoráveis para o estabelecimento da nova planta. Assim, a dormência é um recurso que além de permitir que as sementes fiquem viáveis no solo por vários anos, também possibilita a germinação escalonada de indivíduos, visando a perpetuação da espécie (Gu et al., 2006). Este é um dos fatores que aliado à falta de controle adequado contribui para a realimentação do banco de sementes do solo e que faz do arroz vermelho (*Oryza sativa*) a planta daninha com maior importância na cultura do arroz irrigado.

A dormência das sementes é considerada um caráter genético complexo, controlado por múltiplos genes (QTLs), os quais são regulados em função das condições ambientais onde as plantas estão submetidas (Wan et al., 2006; Xie et al., 2011). Assim, acredita-se que a intensidade e o período da dormência são controlados por uma interação genética com o ambiente. O gene *Sdr4* foi apontado por atuar como um regulador intermediário da dormência durante a maturação das sementes (Sugimoto et al., 2010; Li et al., 2011). Através dos resultados encontrados em arroz cultivado é possível considerar este gene um provável candidato a desempenhar algum papel nos mecanismos de dormência também nas sementes de arroz vermelho. Este gene mostrou maior expressão em sementes de arroz vermelho, quando comparadas a cultivares de arroz, com menor nível de dormência. Uma forma de verificar a relação deste gene no caráter de dormência está na observação do comportamento da expressão deste gene em sementes que estão em processo de germinação. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a expressão do gene *Sdr4* 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 em arroz vermelho.

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 *Sdr4* através da técnica RT-PCR em tempo real. Os 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

¹ Bolsista IC Acadêmica da Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre - RS, catimeneguzzi7@hotmail.com.

² Eng^a. Agr^a., Doutoranda, UFRGS.

³ Eng. Agr., PhD, UFRGS.

⁴ Bolsista IC Acadêmico da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

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) constituíam uma repetição, sendo que cada genótipo contou com três repetições. O material foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido (LN₂).

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

Nas etapas de germinação verificou-se que mesmo utilizando sementes com dormência superada, existiam diferenças na velocidade de ocorrência das fases de germinação entre os genótipos de arroz analisados. Isto sugere que em cada fase do processo de germinação podem existir variações nos níveis de expressão dos genes envolvidos neste processo. Estas diferenças foram levadas em consideração para a análise de expressão do gene *Sdr4* e encontram-se na Tabela 1.

TABELA 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).

HAEG	Genótipos						
	AV 223	AV 503	AV 508	AV 511	IRGA 417	Kayb.	Glab.
12 horas	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
24 horas	SA	SA	SA	SA	FI	SA	SA
36 horas	FI	FI	FI	FI	FII	FI	FI
48 horas	FII	FI	FI	FII	FIII	FII	FII
60 horas	FII	FII	FIII	FIII	G	G	G

O gene *Sdr4* mostrou ser expresso durante o processo de germinação das sementes em todas as etapas avaliadas, às 12, 24, 36, 48 e 60 HAEG. Os níveis de expressão deste gene teve pouca variação entre os genótipos e momento da avaliação (Figura 1). Às 12 HAEG todos os genótipos apresentavam suas sementes sem alterações visíveis (SA) (Tabela 1). Neste momento o genótipo *O. glaberrima* apresentou o maior nível de expressão relativa do gene *Sdr4* (Figura 1 A). Às 24 HAEG, os genótipos *O. glaberrima* e AV 223 mostraram os maiores níveis de expressão relativa do gene *Sdr4* (Figura 1 B). Às 36 HAEG a maior expressão relativa é mostrada pelo genótipo *O. glaberrima*, os demais ecótipos apresentam expressão inferior ou semelhante a cultivar Kaybonnet. Às 48 e 60 HAEG é possível verificar redução na magnitude da expressão do gene *Sdr4* nos genótipos avaliados, pois a nível de expressão relativa apresentado por todos os genótipos fica próximo ou inferior a cultivar Kaybonnet (Figura 1 D e E). Cabe salientar que nas análises da expressão do gene *Sdr4* durante o período de formação do embrião e embrião maduro

os maiores níveis de expressão do gene *Sdr4* foram observados nos ecótipos de arroz vermelho (dados não publicados). Entretanto, isto não ocorreu nos resultados de análise de expressão do gene *Sdr4* durante a germinação às 12, 24, 36, 48 e 60 HAEG, quando não foi possível relacionar as diferenças nos níveis de expressão com ecótipos de arroz vermelho e cultivares de arroz. Este fato pode ser explicado, pois antes das sementes serem colocadas para germinar, as sementes tiveram a dormência superada e estavam aptas ao processo de germinação. Ainda, o fato da cultivar IRGA 417 apresentar os menores níveis de expressão do gene *Sdr4* em todas as etapas avaliadas durante a germinação (Figura 1) e apresentar a maior velocidade de germinação (Tabela 1), pode indicar que o gene *Sdr4* esteja de fato associado aos processos que reprimem a expressão de genes de germinação.

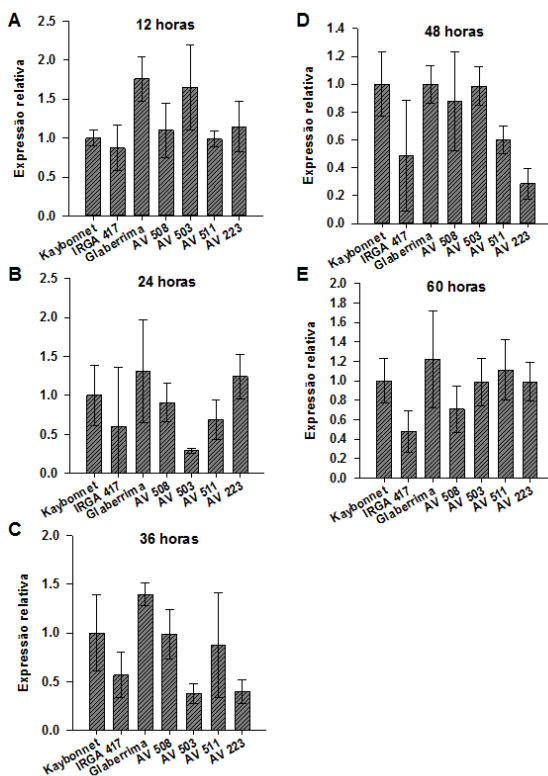


FIGURA 1. Expressão relativa do gene *Sdr4* em genótipos de arroz, na região do embrião em processo de germinação, às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação (HAEG). Médias e desvio padrão apresentados.

Outros estudos também indicam a relação deste gene com o caráter de dormência das sementes (Sugimoto et al., 2010; Li et al., 2011b). Em um destes estudos observaram-se dois mutantes *sdr4*, M101 e M125, que apresentaram ausência completa de dormência nas sementes, pois apresentaram 100% de suas sementes germinadas quatro semanas após a colheita (Sugimoto et al., 2010). Outra evidência da relação do gene *Sdr4* com o caráter de

dormência foi relatada por Li et al. (2011b). Através de estudos de QTLs para este caráter verificaram que a região *qDGR7*, onde está localizado o gene *Sdr4*, apresenta forte influência sobre o caráter de dormência (Li et al., 2011). A expressão do *Sdr4* é regulada por *OsVP1*, que regula o potencial de dormência das sementes e reprime a expressão de genes de germinação (Sugimoto et al., 2010). Assim, sugere-se que *Sdr4* atua como um regulador intermediário da dormência na maturação das sementes (Sugimoto et al., 2010).

CONCLUSÃO

As sementes do gênero *Oryza* apresentam diferenças na velocidade de germinação, mesmo quando na ausência da dormência. A expressão do gene *Sdr4* mostra-se relacionada ao caráter dormência das sementes de arroz vermelho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**. Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.
- GU, X. Y., KIANIAN, S. F. e FOLEY, M. E. Dormancy genes from weedy rice respond divergently to seed development environments. **Genetics**. Baltimore, v. 172, n. 2, p. 1199-1211, 2006.
- LI, W., et al. Quantitative trait loci for seed dormancy in rice. **Euphytica**. Wageningen, v. 178, n. 3, p. 427-435, 2011.
- SUGIMOTO, K., et al. Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. **Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 107, n. 13, p. 5792-5797, 2010.
- WAN, J. M., et al. Genetic dissection of the seed dormancy trait in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**. Clare, v. 170, n. 4, p. 786-792, 2006.
- XIE, K., et al. Identification of QTLs for seed dormancy in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Breeding**. Malden, v. 130, n. 3, p. 328-332, 2011.