

SINTENIA DO GENE DE ALFA-AMILASE *AMY1* EM ARROZ ENTRE ESPÉCIES DE INTERESSE ECONÔMICO

Patrícia da Silva Vinholes⁽¹⁾, Géri Eduardo Meneghello⁽²⁾, Mário Borges Trzeciak⁽²⁾, Cibele dos Santos Ferrari⁽²⁾, Paulo Dejalma Zimmer⁽³⁾ ¹Acadêmica em Agronomia, Bolsista PIBIC/CNPq, FAEM/UFPEL, Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, pvinholes@hotmail.com. ²Programa de Pós Graduação em Ciência & Tecnologia de Sementes, FAEM/UFPEL; ³Dr. Professor do Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL.

Entre as gramíneas cultivadas, o arroz é um dos produtos agrícolas de fundamental importância no Brasil, cujo decréscimo na produção acarreta prejuízos consideráveis à economia e à sociedade brasileira. O arroz é considerado atualmente planta modelo das monocotiledôneas para estudos genéticos devido ao seu pequeno genoma (460 MB), disponibilidade de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), seqüências genômicas disponíveis em bancos de dados, alta eficiência de transformação, mapa molecular saturado, inúmeras informações sobre a biologia das células, bioquímica e fisiologia, além da sua grande sintenia com outras gramíneas. O termo "sintenia" refere-se à propriedade de dois ou mais genes estarem localizados no mesmo cromossomo, portanto qualquer conhecimento sobre os genes de arroz pode ser aplicado a importantes produtos brasileiros tais como milho, trigo e cana de açúcar.

A alfa-amilase (Figura 1) é uma importante enzima responsável pela hidrólise do amido, usualmente sintetizada e secretada pela camada de aleurona das sementes (Kigel & Galili, 1995). Durante o desenvolvimento da semente, a camada de aleurona forma um estoque de reservas, enquanto na germinação, constitui-se em uma fonte de enzimas para a mobilização das reservas. Muitos fatores podem influenciar na síntese e atividade de alfa-amilase durante a germinação das sementes, por isso um grande número de estudos de caracterização e expressão desta importante enzima na produção de sementes, vem sendo conduzidos (Fincher, 1989).

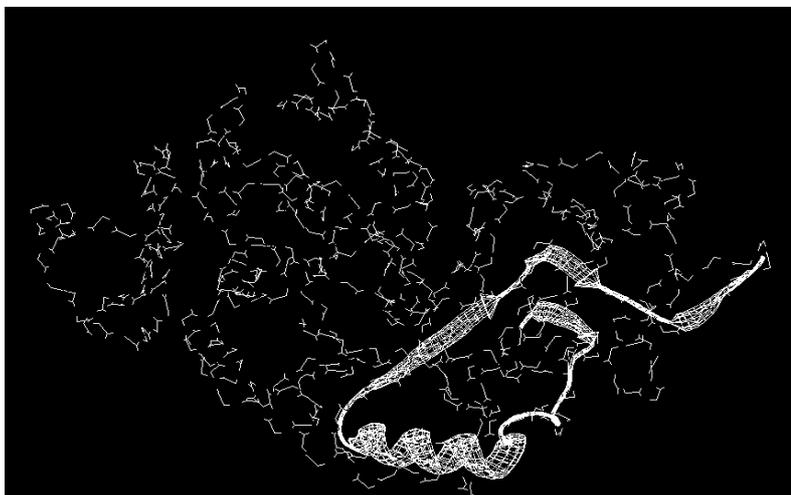


Figura 1. Estrutura tri-dimensional da enzima alfa-amilase codificada pelo gene *AMY1*.

A qualidade de sementes pode ser vista como um padrão de excelência em atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários (Carvalho & Nakagawa, 2000), que vão determinar o desempenho da semente quando semeada ou armazenada.

A pesquisa na área de biologia molecular com ênfase no controle de qualidade das sementes produzidas tem evoluído muito e novas técnicas têm-se mostrado úteis na elucidação dos fatores que afetam a qualidade, a manipulação, a identificação e preservação do material genético, permitindo o monitoramento de todo o processo produtivo (Dantas *et al.*, 2002). Atualmente muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de estudar reações metabólicas que envolvam a síntese e a degradação de moléculas durante o desenvolvimento, a germinação e a deterioração de sementes (Carvalho *et al.*, 2000).

O objetivo do trabalho foi avaliar a sintonia do gene *AMY1* que codifica para a síntese da alfa-amilase no arroz entre espécies de interesse econômico.

A partir do gene que codifica para a enzima alfa-amilase em arroz (*GenBank accession*: X16509) desenhou-se *primers* em uma região interna, utilizando-se para tanto a versão *on-line* do programa PRIMER3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). O fragmento de amplificação é de 461 pares de bases (pb), localizados na posição 2711 e 3172 pb (incluindo a seqüência do *primer*). As seqüências do *primer* foram 5'AAGGTGCGGTGCTCTGCTCT3' (*Forward*) e 5'GCCGATGTCCATCTTGAGCC3' (*Reverse*). Os parâmetros usados para o desenho do *primer* foram: tamanho do *primer* (mínimo 18 e máximo 27 e ótimo 20 pb); temperatura média de anelamento (TM) (mínimo 57°, máximo 63° e ótimo 60°), por fim o conteúdo das bases nitrogenadas Guanina e Citosina (%GC) deveria estar entre 20 e 80%.

Sementes de arroz (controle), azevém, milheto, milho, cevada, sorgo, algodão, feijão, soja e ervilha foram semeadas para realizar a extração de DNA a partir das plântulas. Para extrair o DNA genômico, 10 sementes de cada espécie foram semeadas em bandejas com areia esterilizada. Após 30 dias em casa de vegetação, as plântulas foram coletadas. A extração foi realizada conforme protocolo CTAB 2% (Saghai-Maroo *et al.*, 1984). Aproximadamente 50ng de DNA genômico foi combinado com Tampão 10X PCR, 10mM MgCl₂, dNTPs com 200μM, cada *primer* com 0,1μM, e 1U da enzima *Taq polymerase* para um volume final da reação de 15μl. As reações de amplificação (PCR) foram realizadas em termociclador PTC-100, usando o seguinte programa: 3 minutos em 94 °C, seguido por 35 ciclos de 45 segundos em 94 °C, 45 segundos em 60 °C e 45 segundos em 72 °C, com incubação final de 10 minutos em 72 °C. A partir da mesma seqüência do gene da alfa-amilase, realizou-se um BLAST (Altschul *et al.*, 1990), contra o banco de dados de cada uma das espécies selecionadas para este estudo.

A análise *in silico* das seqüências através do alinhamento local (BLAST) contra o banco de dados de cada uma das espécies selecionadas mostrou que há uma similaridade de 83% entre a alfa-amilase do arroz e do milho e 89% entre arroz e cevada.

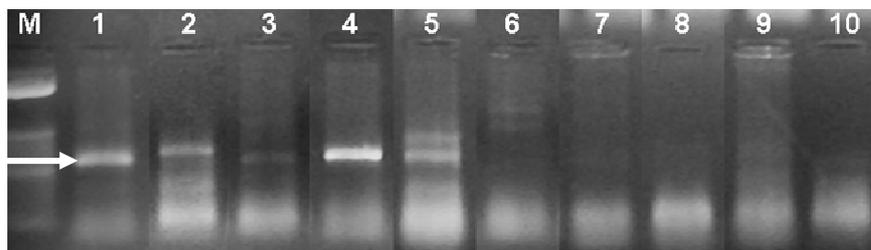


Figura 2. Sintonia do Gene entre as diferentes espécies: Canaleta M – Marcador de Peso Molecular – Ladder 50 pb; 1 – arroz (controle); 2 – azevém; 3 – milheto; 4 – milho; 5 – cevada; 6 – sorgo; 7 – algodão; 8 – feijão; 9 – soja; 10 – ervilha.

De acordo com o observado na Figura 2, houve amplificação em todas as gramíneas, demonstrando uma similaridade entre os genes que codificam para a enzima alfa-amilase em todas essas espécies. Era esperado que fosse observado uma similaridade *in silico* com as demais espécies de gramíneas estudadas, como o milheto, o azevém e o sorgo, porém é possível que a baixa similaridade seja em decorrência da ainda reduzida quantidade de dados existentes nos bancos de dados, quando comparados ao milho, a cevada e ao arroz. Já para as demais espécies, pertencente a outras famílias botânicas não observou-se amplificação do DNA quando utilizou-se *primers* específicos para a enzima alfa-amilase em arroz, e estes dados foram comprovados na análise *in silico*, quando também não foi observado uma similaridade significativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D.J. **J. Molecular e Biologia**. 215:403-410, 1990.

CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.R. Aplicação de técnicas moleculares no controle de qualidade de sementes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.3, n.17, p.44-47, 2000.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes, Ciência, Tecnologia e Produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000.

DANTAS, B. F. *et al*. RT-PCR patterning for alpha-amylase messenger RNA identification in germinating maize seeds. **Rev. bras. sementes.**, Pelotas, v. 24, n. 2, 2002.

FINCHER, G.B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n.1, p.305-346, 1989.

FINCHER, G. B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review Plant Physiology Molecular Biology**, Palo Alto, v.40, p.305-346, 1989.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.

SAGHAI-MAROOF, M.A., SOLIMAN, K.M., JORGENSEN, R.A. et al. Ribosomal DNA apace – length polymorphism's in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** v.81, p. 8014 – 8018, 1984.

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).