



## **EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE FRAGMENTOS DE cDNA DURANTE A GERMINAÇÃO/EMERGÊNCIA DO ARROZ**

**MACHADO, Ronei Dorneles<sup>1</sup>; ZIMMER, Paulo Dejalma<sup>2</sup> ; AMARAL, Fernanda Plucani do<sup>3</sup>; HENNING, Fernando Augusto; MERTZ, Liliane Marcia**

<sup>1</sup>Deptº de Fitotecnia – FAEM/UFPeI  
Campus Universitário CEP 96010-900.roneidm@hotmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo e se constitui num modelo para a genética e fisiologia das plantas cultivadas (BENNETZEN & FREELING, 1993; GALE & DEVOS, 1998; BENNETZEN, 2002), devido ao elevado conteúdo informativo disponível (PENNISI, 2000; GOFF et al., 2002).

Estudos demonstraram alta variabilidade genética entre diferentes ecótipos de arroz vermelho para o caráter germinação/emergência a grandes profundidades (PESKE, et al.; 1993; PESKE, et al., 1997; SGUAREZI et al., 2003), tornando-os importantes para o mapeamento de caracteres e identificação de genes de interesse.

A técnica de cDNA/AFLP permite a caracterização detalhada da expressão dos genes envolvidos em diferentes processos biológicos, tendo sido amplamente utilizada, se mostrando eficiente e confiável. Portanto, a comparação da expressão gênica de genótipos de arroz com contraste fenotípico durante a germinação das sementes e emergência das plântulas proporcionará o desenvolvimento de novos estudos voltados a identificação e caracterização dos genes envolvidos.

O objetivo desse trabalho consiste na identificação de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos durante a germinação/emergência do arroz.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram selecionadas sementes de arroz de três diferentes genótipos, a cultivar BRS 7 “Taim”, o ecótipo de arroz vermelho FFS-45 e a cultivar Nippombare, as quais foram semeadas em casa de vegetação a 15 cm de profundidade, cobrindo-se com areia esterilizada. O material foi coletado aos quatro, aos sete, 14 e 21 dias após a semeadura.

A técnica para obtenção dos fragmentos consistiu nas etapas de extração do RNA total, obtenção do cDNA dupla fita, e avaliação do polimorfismo genético pela técnica de cDNA-AFLP.

Para extração do RNA total, foi utilizado o reagente *PURE LINK PLANT RNA REAGENT* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, foi obtido um *bulk* com RNA total de cada época e para cada genótipo para a posterior síntese de cDNA.

O cDNA dupla fita foi sintetizado utilizando o *kit SuperScript Double Stranded cDNA Synthesis* (Invitrogen), seguindo as recomendações de uso do produto. Após a síntese, o cDNA foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK et al., 2001).

Ao cDNA obtido, aplicou-se a técnica de AFLP, (ZABEAU 1993; VOS et al., 1995) utilizando-se o *Kit AFLP Starter Primer* (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Foram testadas 10 combinações de *primers* disponíveis no *kit*.

As etapas de digestão do cDNA com enzimas de restrição, ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos de cDNA, pré-amplificação dos fragmentos utilizando os *primers*, amplificação seletiva e eletroforese dos fragmentos de cDNA amplificados, em gel de poliacrilamida 6% corado com Nitrato de Prata (BEIDLER, 1982).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese do cDNA foi positiva para os 3 genótipos em estudo. Na figura 1 podem ser observados os resultados obtidos para duas das 10 combinações de *primers* testadas. Com o *primer* um (figura 1A), foi possível observar um total de cinco fragmentos de cDNA diferencialmente expressos entre os diferentes genótipos. Já com a segunda combinação de *primers* testada (FIGURA 1B) foram obtidos apenas três fragmentos polimórficos.

Essas bandas que se apresentaram polimórficas entre os diferentes genótipos representam fragmentos de genes diferencialmente expressos na germinação/emergência de sementes submetidas a altas profundidades de semeadura e, portanto tornam-se promissoras para estudos que visem a identificação dos genes relacionados a esses processos fisiológicos. Através da eluição desses fragmentos para posterior clonagem e seqüenciamento será possível a identificação de genes relacionados aos caracteres de interesse nesse estudo.



**Figura 1.** cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 6% corado com Nitrato de Prata, onde foram testados 2 combinações de *primers* *EcoRI* e *MseI* nos genótipos Nippombare (1), Arroz vermelho (2) Taim (3) e em cada um dos genótipos foi realizado um *bulk* de cDNA contendo todas as épocas coletadas previamente determinadas no trabalho . As setas assinaladas na figura representam fragmentos de cDNA-AFLP que apresentaram-se polimorficos entre os genótipos.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de cDNA-AFLP foi eficiente na obtenção de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos, em genótipos de arroz contrastantes para o caráter de germinação/emergência a altas profundidades de semeadura.

Através do isolamento, clonagem e seqüenciamento dos fragmentos de cDNA amplificados poderão ser identificados genes/proteínas relacionados ao caráter em estudo.

## 5.AGRADECIMENTOS

A CAPES, FAPERGS e CNPq pelo auxílio financeiro e pela concessão das bolsas de estudo.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEIDLER, J.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L.; Ultra sensitive staining of nucleic acids with silver nitrate. 1982.

BENNETZEN, J.; FREELING, M. Grasses as a single genetic system – genome composition, colinearity and compatibility. **Trends in Genetics**, v. 9, p. 259-261, 1993.

BENNETZEN, J. The rice genome: Opening the door to comparative plant biology. **Science**, Washington, v.296, n.5565, p.60-63, 2002.

GALE, M.D.; DEVOS, K.M. Plant comparative genetics after 10 years. **Science**, Washington, v.282, n.5389, p.656-659, 1998.

PENNISI, E. Stealth genome rocks rice researchers. **Science**, Washington, v.288, n.5464, p.239-241, 2000.

GOFF, S. A.; RICHE, D.; LAN, RH. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*), **Science**, v. 296, p. 92-100, 2002.

PESKE, S.T.; PERRETO, E.; GALLI, J. Avaliação de sementes e plantas de arroz daninho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 15, n.1, p. 49-54, 1993.

PESKE, S.T.; BARROS, A. C. S. A.; NUNES, M. M.; FERREIRA, L. H. Sobrevivência de sementes de arroz

vermelho depositadas em solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 3, n. 1, p. 17-22, 1997

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor University Press**, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

SGUAREZI, C.N.; PESKE, S.T.; BOBROWSKI, V.L.; MOREIRA, H.L.M. Análise da qualidade fisiológica do arroz vermelho (*Oryza sativa* L.). **Informativo ABRATES**. v.13, n.3, p. 75, 2003

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application No 0534858, 1993.