

## FRAGMENTOS DE GENES DE ARROZ DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS SOB ESTRESSE DA PROFUNDIDADE DE SEMEADURA

VENSKE, Eduardo<sup>1</sup>; AMARAL, Fernanda Plucani do<sup>1</sup>; VIANA, Taiane Peres<sup>1</sup>; BAHRY, Carlos André<sup>1</sup>; ZIMMER, Paulo Dejalma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept<sup>o</sup> de Fitotecnia. FAEM – UFPel  
Campus universitário, CEP 96010-900. [eduardo.venske@yahoo.com.br](mailto:eduardo.venske@yahoo.com.br)

### 1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda pelo arroz, considerada a espécie cultivada de maior potencial para o combate à fome mundial, devido a sua versatilidade e adaptabilidade a diferentes condições de solo e clima, remete ao melhoramento genético na busca de mecanismos ligados a resistência das plantas a diferentes estresses bióticos e abióticos, alta produtividade e qualidade, além de estabilidade produtiva.

O arroz cultivado está sujeito a vários tipos de estresses abióticos, dentre os quais o da profundidade de semeadura. O arroz vermelho caracteriza-se por apresentar maior longevidade quando as sementes são depositadas em profundidade maior (NOLDIN, 1995), e o desenvolvimento de sua parte aérea é superior ao cultivado quando submetido a esse estresse. Nesse sentido, acessos de arroz vermelho têm sido muito utilizados, pois possuem uma gama de genes ainda não identificados, que podem ser incorporados ao genoma do arroz cultivado conferindo benefícios (AMARAL, 2010), principalmente genes envolvidos no processo de germinação / emergência.

O desenvolvimento de pesquisas com enfoque molecular utilizando genótipos de arroz com contraste fenotípico, através da técnica de cDNA/AFLP (MAO et al., 2004), permite a separação de fragmentos de genes relacionados aos contrastes existentes entre os genótipos e em diferentes fases de desenvolvimento, o que possibilita a identificação de enzimas envolvidas nas rotas metabólicas que participam do processo de germinação / emergência do arroz, sendo que essas informações podem ser futuramente utilizadas nos programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de genótipos com desempenho superior para o caráter estudado, através da seleção assistida por marcadores moleculares (AMARAL, 2010).

O estudo teve por objetivo isolar e avaliar fragmentos de genes diferencialmente expressos durante o processo de germinação / emergência do arroz, submetido ao estresse de profundidade de semeadura.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram utilizados três genótipos de arroz para comparação da expressão diferencial de genes no processo de germinação / emergência: a cultivar BRS 7 Taim, sensível a semeadura a grandes profundidades, o ecótipo de arroz vermelho FFS-45, tolerante a semeadura em grandes profundidades, e a cultivar Nipponbare, que possui seu genoma seqüenciado e disponível em bancos de dados.

Os materiais foram semeados a 15 cm de profundidade em tubos de PVC sobre bandejas plásticas, com areia esterilizada. O tecido vegetal foi obtido através de coletas em quatro etapas: aos 04, 07, 14 e 21 dias após a semeadura,

contemplando o período em que provavelmente os principais genes estão sendo expressos.

O RNA total foi isolado com a utilização do reagente *Trizol* (*Invitrogen*<sup>®</sup>), e a obtenção de cDNA foi através do Kit *SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis* (*Invitrogen*<sup>®</sup>) conforme instruções do fabricante.

A detecção dos fragmentos de genes diferencialmente expressos foi executada conforme (Habu et al., 1997). Foram testadas 16 combinações de *primers* do *AFLP Starter Primer Kit* (*Invitrogen*<sup>®</sup>), conforme instruções do fabricante (*E-AAG / M-CAC*, *E-AAG / M-CTG*, *E-ACA / M-CAA*, *E-ACA / M-CTT*, *E-ACC / M-CAC*, *E-ACC / M-CTC*, *E-ACG / M-CAT*, *E-ACT / M-CTA*, *E-ACT / M-CTC*, *E-ACT / M-CTG*, *E-AGC / M-CAA*, *E-AGC / M-CAC*, *E-AGC / M-CAT*, *E-AGC / M-CTA*, *E-AGG / M-CAC*, *E-AGG / M-CAG*)

Para visualização dos fragmentos de genes diferencialmente expressos, obtidos através da técnica de cDNA/AFLP, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% de concentração, revelado com nitrato de prata, conforme Beidler (1982).

A avaliação dos resultados foi feita através da observação da presença / ausência, além de intensidade, dos fragmentos presentes individualmente em cada um dos três genótipos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 16 combinações de *primers* utilizadas somente três (*E-AGC / M-CAC*, *E-AAG / M-CTG* e *E-ACA / M-CTT*) não apresentaram amplificação e as 13 combinações restantes apresentaram 95 fragmentos diferencialmente expressos relacionados aos genótipos estudados.

Considerando a análise individual de cada genótipo, na cultivar BRS 7 Taim, foram identificados 26 fragmentos diferencialmente expressos. No ecótipo de arroz vermelho FFS-45 foi possível identificar 41 fragmentos diferencialmente expressos. Por outro lado, somente sete fragmentos foram observados exclusivamente na variedade Nipponbare. Esse elevado número de fragmentos contrastantes comprova a alta variabilidade genética que pode estar relacionada ao caráter germinação / emergência, como pode ser observado na Figura 1. O elevado número de fragmentos encontrados somente no ecótipo FFS-45 possivelmente estejam relacionados com a capacidade de desenvolvimento das plantas de arroz vermelho em condições de estresse de profundidade de semeadura, conferindo-lhes um desempenho superior ao arroz cultivado. De acordo com Malone et al. (2007) o arroz vermelho possui um elevado grau de polimorfismo, comprovado pelo uso de marcadores microssatélites e isoenzimas.

Cinco fragmentos foram observados na cultivar Taim que também estão presentes no arroz vermelho, da mesma forma, na comparação entre arroz vermelho e Nipponbare, foram identificados 15 fragmentos. Ainda foi possível notar um fragmento presente nas cultivares Taim e Nipponbare que não está presente no ecótipo de arroz vermelho.

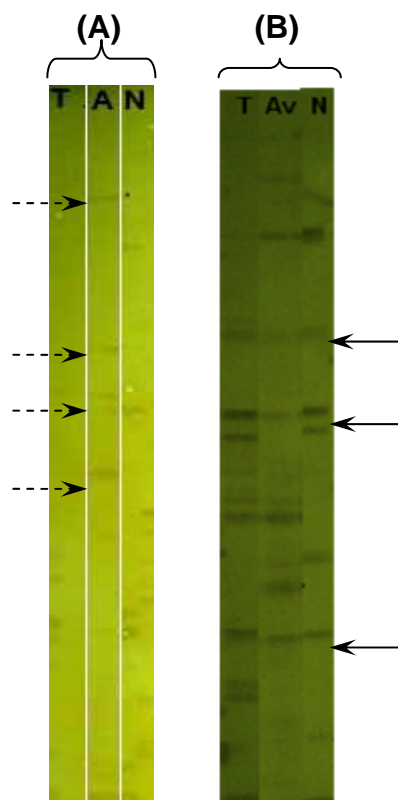


Figura 1 – Separação de fragmentos através da técnica de cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5% corado com Nitrato de Prata. Os fragmentos foram obtidos utilizando as combinações de *primers* (A) *E-AGG / M-CAG*, (B) *E-ACC / M-CAC*. As setas pontilhadas indicam alguns dos fragmentos identificados no ecótipo de arroz vermelho, e as setas contínuas apontam fragmentos presentes nos três genótipos. 'T' – Taim; 'A' ou 'AV' – Arroz Vermelho e 'N' – Nippombare.

Alguns fragmentos presentes nos três genótipos apresentaram diferença na intensidade de bandas. Segundo Breyne et al. (2003), devido ao uso de géis de alta resolução, as diferenças na intensidade das bandas que podem ser observadas, fornecem uma boa medida da diferença relativa nos níveis de expressão do gene. Estes fragmentos mais intensos comprovam que alguns genes podem ter sua atividade acentuada em determinado estágio de desenvolvimento da plântula, sendo que estas podem representar respostas a fatores ambientais, como estresses ou tolerância.

A técnica de cDNA - AFLP permite identificar fragmentos de diferentes pesos moleculares numa escala de 100 a 1000pb e, como as bandas observadas, indiferentes das combinações de *primers*, apresentaram peso molecular entre 200 e 100pb, o que confere com outros trabalhos que utilizaram a mesma técnica em arroz (FERRARI, 2008), a técnica é apropriada para a identificação de fragmentos de genes diferencialmente expressos em diferentes genótipos de arroz, quando submetidos a grande profundidade.

#### 4 CONCLUSÕES

O ecótipo de arroz vermelho FFS-45 possui alto grau de polimorfismo na germinação / emergência quando comparado ao arroz cultivado.

Há diferenças na intensidade da expressão gênica no momento da germinação / emergência entre os genótipos vermelho, Taim e Nippombare.

A técnica de cDNA - AFLP é eficiente para a identificação de fragmentos de genes diferencialmente expressos em arroz vermelho e cultivado, quando submetidos a grande profundidade.

## 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, CAPES, FAPERGS e FINEP pelo auxílio financeiro e pela concessão de bolsas de estudo.

## 6 REFERÊNCIAS

AMARAL, Fernanda Plucani do. **Fragmentos de genes diferencialmente expressos durante a germinação/emergência do arroz sob estresse da profundidade**. Março de 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Capão do Leão, 22 de Março de 2010.

BEIDLER, J.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L. Ultra sensitive staining of nucleic acids with silver nitrate. **Analytical Biochemistry**, United States, v.1, n. 126(2), p.374-80. 1982.

BREYNE, P.; DREESEN, R.; CANNOOT, B.; ROMBAUT, D.; VANDEPOELE, K.; ROMBAUTS, S.; VANDERHAEGHEN, R.; INZÉ, D.; ZABEAU, M. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. **Molecular Genetics and Genomics**. v.269, n.2, p.173-9, 2003.

FERRARI, Cibele dos Santos. **Expressão diferencial de genes do mutante de arroz M3-202 sob baixas temperaturas na germinação**. 2008. 45f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HABU, Y.; FUKUDA-TANAKA, S.; HISATOMI, Y.; LIDA, S. Amplified restriction fragment length polymorphism based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-pb sequence. **Biochemical and Biophysical Research Communications** n. 234, p. 516 - 521, 1997.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; CASTRO, M. A. da S.; ARIAS, L. N.; MENEGHELLO, G.; PESKE, S. T. Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no estado do rio grande do sul. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, Brasil, v.37, n.2, p. 77 - 85, 2007.

MAO, C.; YI, K.; YANG, L.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F. e WU, P. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, EUA, v.55, n.394, p.137-143, 2004.

NOLDIN, J.A. **Characterization, seed longevity, and herbicide sensitivity of red rice (*Oryza sativa* L) ecotypes, and red rice control in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]**.1995. Thesis (PhD) – A&M University, Texas, 1995.