

EFEITO DE MUTAGÊNICOS QUÍMICO E FÍSICO NA INDUÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENOMA DO ARROZ

ANTÔNIO DE AZEVEDO PERLEBERG¹; EDUARDO VENSKE²; VIVIANE KOPP DA LUZ³; LATÓIA EDUARDA MALTZAHN⁴; ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA⁵; CAMILA PEGORARO⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – azevedoperleberg@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – eduardo.venske@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas – vivikp05@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – latoiaeduarda@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – acostol@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Com mais de 100.000 cultivares no mundo, o arroz é uma das culturas mais importantes para a alimentação humana (LEE et al. 2020). Apesar do grande número de cultivares, novos genótipos devem ser desenvolvidos para atender a demanda de alimentos e o impacto das mudanças climáticas. No entanto, devido à forte pressão de seleção feita nos programas de melhoramento e ao uso de cultivares elite, tanto pelos agricultores, quanto pelos melhoristas nos blocos de cruzamento, houve um estreitamento da variabilidade genética do arroz (BUSANELO et al. 2020).

A indução de mutações no melhoramento genético é uma estratégia para criação de variabilidade genética em caracteres de interesse agrônomo. Essa ferramenta pode ser utilizada para o desenvolvimento de novas cultivares com maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, e com maior potencial de rendimento. A abordagem tradicional inclui a utilização de agentes físicos (ex.: radiação gama - γ) e químicos (ex.: etilmetanossulfonato - EMS) para indução de mutações aleatórias. Novas técnicas de melhoramento, como a edição de genomas, permitem induzir mutações em locais específicos (HERNÁNDEZ-SOTO et al. 2021; ZHANG et al. 2022).

A radiação ionizante, como a gama, é capaz de causar captura ou liberação de elétrons e romper diretamente as ligações químicas das moléculas quando passam pela matéria. Além disso, esse tipo de radiação promove a produção de espécies reativas de oxigênio, que danificam os componentes da célula. Radiações ionizantes ocasionam modificações nas bases dos nucleotídeos, quebras de uma ou de ambas as fitas do DNA. O reparo dessas lesões pode levar a substituições, deleções e inserções de bases, e inversões e translocações nas sequências dos cromossomos (LI et al. 2019).

O EMS é um agente de alquilação, que introduz um grupo alquil no N⁷ e no O⁶ da guanina. Guanina com alquilação no N⁷ ainda é reconhecida como guanina, então essa alquilação não é mutagênica. Por outro lado, devido a sua conformação, a guanina com alquilação no O⁶ não pode parear com citosina, apenas com timina, resultando na substituição do par G/C por A/T. Em arroz, 70% das mutações induzidas por EMS são transições G/C para A/T (YAN et al. 2021). O EMS também pode ocasionar deleção ou inserção de nucleotídeos e quebra de cromossomos (TAN et al. 2019).

O efeito dos agentes mutagênicos varia de acordo com as doses, tempos de exposição e características do genoma de cada espécie. Entender essa dinâmica é importante na utilização dessa ferramenta no melhoramento genético. Dessa

forma, o objetivo desse estudo foi estimar o efeito da radiação gama e do EMS na indução de mutações de substituição de bases no genoma do arroz.

2. METODOLOGIA

Neste estudo foram analisados três linhas mutantes derivadas da cultivar BRS Querência e cinco linhas mutantes derivadas da cultivar BRS Pampeira, ambas em geração M₅. Também foram analisadas as cultivares originais, BRS Querência e BRS Pampeira. Mutantes da BRS Querência foram obtidos pelo tratamento de sementes com o agente mutagênico etilmetanossulfonato 1.5% (v/v) (0.15 M) durante 2h. Já os mutantes da BRS Pampeira foram obtidos pelo tratamento de sementes com radiação gama (⁶⁰Co), nas doses de 250 e 300Gy. Mutantes da BRS Querência e mutantes da BRS Pampeira foram conduzidas em campo até geração M₅.

O DNA foi extraído das folhas das linhas mutantes e das cultivares usando protocolo CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) (DOYLE e DOYLE 1990). Após verificar a qualidade e a quantidade do DNA, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Serviços de Genotipagem do Instituto Internacional de Investigação do Arroz (*International Rice Research Institute* – IRRI), nas Filipinas. As amostras foram genotipadas com 7097 marcadores SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único), utilizando a plataforma *7K Infinium SNP* (Illumina®) (THOMSON et al. 2017).

Os resultados das linhas mutantes foram comparados com os resultados das respectivas cultivares originais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de genotipagem utilizada nesse estudo, com 7097 SNPs, possibilita acessar apenas uma pequena fração do genoma do arroz (0,001%). Porém, os SNPs estão distribuídos de forma aleatória em todos os cromossomos, e são regiões passíveis de mutações de substituição de base única. Portanto, essa abordagem traz uma informação inicial acerca do efeito dos agentes mutagênicos EMS (químico) e radiação gama (físico) na indução de mutações de substituição de bases em arroz.

Ao avaliar os 7097 locos marcadores, se verifica que o EMS causou menor número de substituição de base única quando comparado à radiação gama (Tabela 1). Esse resultado pode ser explicado pelo fato que, de maneira geral, a radiação gama apresenta maior potencial para causar mutações do que o EMS (ZHANG et al. 2022).

Tabela 1. Comparação de linhas mutantes (M₅) com as respectivas cultivares de origem (tipo selvagem) em relação a 7097 marcadores SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único).

Mutagênico	Linhas mutantes	SNPs diferentes	SNPs iguais
Raio gama	250/M519 x BRS Pampeira	858 (12,09%)	6239 (87,91%)
Raio gama	250/M636 x BRS Pampeira	855 (12,05%)	6242 (87,95%)
Raio gama	250/M498 x BRS Pampeira	1302 (18,35%)	5795 (81,65%)
Raio gama	250/M425 x BRS Pampeira	1354 (19,08%)	5743 (80,92%)
Raio gama	300/M267 x BRS Pampeira	659 (9,29%)	6438 (90,71%)
EMS	M1150 x BRS Querência	8 (0,11%)	7089 (99,89%)
EMS	M1313 x BRS Querência	7 (0,10%)	7090 (99,90%)
EMS	M1410 x BRS Querência	10 (0,14%)	7087 (99,86%)

A média de mutações de substituição de base única induzida por radiação gama (~1000 em 7094 marcadores SNPs) (Tabela 1) é divergente dos dados disponíveis na literatura. Em um estudo desenvolvido por YANG et al. (2019), usando radiação gama (250Gy) em arroz, foi sequenciado o genoma dos mutantes e da cultivar de origem. Os autores observaram a ocorrência de diferentes tipos de mutações, e encontraram em média 65 substituições de base única. Usando uma abordagem similar de identificação de mutações, LI et al. (2019) observaram resultado parecido, em média 57 substituições de base única em mutantes de arroz obtidos por radiação gama.

Embora em menores proporções, a média de mutações de substituição de base única induzida por EMS (~8 em 7094 marcadores SNPs) (Tabela 1) também diverge de estudos anteriores. Usando análise de sequenciamento YAN et al. (2021) verificaram que mutantes de arroz obtidos por tratamento com EMS (0.7% durante 12h) apresentaram de 80 a 1.091 (média de 334,55) substituições de base única.

Delinear e compreender os efeitos dos agentes mutagênicos sobre o genoma é uma função muito complexa, visto que inúmeros fatores estão envolvidos. Por exemplo, a metilação do DNA (marca epigenética) tem papel direto e indireto na estabilidade do genoma. A hipermetilação do DNA impede a expressão de genes que codificam proteínas de reparo do DNA, e impossibilita o recrutamento dessas proteínas para as regiões danificadas. Além disso, as citosinas metiladas são intrinsicamente mais propensas à mutação do que as citosinas não metiladas (BRABSON et al. 2021). Fatores ambientais e intrínsecos do genoma interferem no padrão de metilação do DNA. Dessa forma, genótipos distintos, cultivados em diferentes regiões, podem responder de forma individual aos agentes mutagênicos.

Outro fator a ser considerado é o tempo de exposição à radiação gama. A expressão de genes codificadores proteínas de reparo do DNA e de enzimas do sistema antioxidante diminui com o aumento do tempo de exposição. Adicionalmente, quanto maior a duração da irradiação, maior será a geração de radicais livres (HONG et al. 2022). Portanto, esse fator também pode explicar a variação no número de mutações induzidas por radiação gama nos diferentes estudos.

4. CONCLUSÕES

Com base nas regiões genômicas analisadas neste estudo (7097 marcadores SNPs previamente identificados) foi observado que a radiação gama causou maior número de substituição de base única do que o EMS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LEE, S.-I.; PARK, J.W.; KWON, S.-J.; JO, Y.D.; HONG, M.J.; KIM, J.-B.; CHOI, H.-I. Epigenetic Variation Induced by Gamma Rays, DNA Methyltransferase Inhibitors, and Their Combination in Rice. **Plants**, v.9, 1088. 2020.
- BRABSON, J.P.; LEESANG, T.; MOHAMMAD, S.; CIMMINO, L. Epigenetic Regulation of Genomic Stability by Vitamin C. **Frontiers in Genetics**. v. 12, n. 675780. 2021.
- BUSANELLO, C.; VENSKE, E.; STAFEN, C.F.; PEDROLO, A.M.; DA LUZ, V.K.; PEDRON, T.; PANIZ, F.P.; BATISTA, B.L.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.M.; COSTA DE OLIVEIRA, A.; PEGORARO, C. Is the genetic variability of elite rice in Southern Brazil really disappearing? **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 20(2), n. e262620214. 2020.

- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- LI, F.; SHIMIZU, A.; NISHIO, T.; TSUTSUMI, N.; KATO, H. Comparison and Characterization of Mutations Induced by Gamma-Ray and Carbon-Ion Irradiation in Rice (*Oryza sativa* L.) Using Whole-Genome Resequencing. **G3**. v. 9(11), p. 3743-3751. 2019.
- HERNÁNDEZ-SOTO, A.; ECHEVERRÍA-BEIRUTE, F.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; VALDEZ-MELARA, M.; BOCH, J.; GATICA-ARIAS, A. Rice breeding in the new era: Comparison of useful agronomic traits. **Current Plant Biology**. v.27, 2021.
- HONG, M.J.; KIM, D.Y.; JO, Y.D.; CHOI, H-I.; AHN, J-W.; KWON, S-J.; KIM, S.H.; SEO, Y.W.; KIM, J-B. Biological Effect of Gamma Rays According to Exposure Time on Germination and Plant Growth in Wheat. **Applied Sciences**. v. 12(6), n. 3208. 2022.
- TAN, C.; ZHANG, X.Q.; WANG, Y.; WU, D.; BELLGARD, M.I.; XU, Y.; SHU, X.; ZHOU, G.; LI, C. Characterization of genome-wide variations induced by gamma-ray radiation in barley using RNA-Seq. **BMC Genomics**. v. 20, n. 783. 2019.
- THOMSON, M.L.; SINGH, N.; DWIYANTI, M.S.; WANG, D.R., WRIGHT, M.H.; PEREZ, F.A.; DECLERCK, G.; CHIN, J.H.; MALITIC-LAYAOEN, G.A.; JUANILLAS, V.M.; DILLA-ERMITA, C.J.; MAULEON, R.; KRETZSCHMAR, T.; MCCOUCH, S.R. Largescale deployment of a rice 6 K SNP array for genetics and breeding applications. **Rice**. v.10, n.40. 2017.
- YAN, W.; DENG, X.W.; YANG, C.; TANG, X. The Genome-Wide EMS Mutagenesis Bias Correlates with Sequence Context and Chromatin Structure in Rice. **Frontiers in Plant Science**. v. 12, n. 579675. 2021.
- YANG, G.; LUO, W.; ZHANG, J.; YAN, X.; DU, Y.; ZHOU, L.; LI, W.; WANG, H.; CHEN, Z.; GUO, T. Genome-Wide Comparisons of Mutations Induced by Carbon-Ion Beam and Gamma-Rays Irradiation in Rice via Resequencing Multiple Mutants. **Frontiers in Plant Science**. v. 10, n. 1514. 2019.
- ZHANG, X.; YANG, F.; MA, H.; LI, J. Evaluation of the Saline-Alkaline Tolerance of Rice (*Oryza sativa* L.) Mutants Induced by Heavy-Ion Beam Mutagenesis. **Biology**. v.11(1), n.126. 2022.