

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes

Tese



**Expressão diferencial de genes na germinação do mutante de arroz M3-202
sob baixas temperaturas**

Cibele dos Santos Ferrari

Pelotas, 2008

Cibele dos Santos Ferrari

**Expressão diferencial de genes na germinação do mutante de arroz M3-202
sob baixas temperaturas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Dr. Paulo Dejalma Zimmer

Pelotas, 2008

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F376e Ferrari, Cibele dos Santos

Expressão diferencial de genes na germinação do mutante de arroz M3-202 sob baixas temperaturas / Cibele dos Santos Ferrari ; Paulo Dejalma Zimmer, orientador. — Pelotas, 2008.

52 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2008.

1. Oryza sativa. 2. Mutação. 3. Frio. 4. cDNA/AFLP. I. Zimmer, Paulo Dejalma, orient. II. Título.

CDD : 633.18

Cibele dos Santos Ferrari

**Expressão diferencial de genes na germinação do mutante de arroz M3-202
sob baixas temperaturas**

**Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes,
Universidade Federal de Pelotas**

Data da Defesa: 30/09/2008

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer (Orientador)
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal de Pelotas**

**Prof. Dr. Antonio Carlos Souza Albuquerque Barros
Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas**

**Prof. Dr. Luis Osmar Braga Schuch
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal de Pelotas**

**Prof. Dr. Edgar Ricardo Schöffel
Doutor em Produção Vegetal pela Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho**

**Prof. Dr. Paulo Ricardo Reis Fagundes
Doutor em Agronomia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Dedico este trabalho aos meus pais, que
nunca mediram esforços na educação de seus filhos.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Mercedes e Brasil, e irmãos, Cristiane, Leandro e Leonardo, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram durante todos estes anos de formação, com muita paciência e dedicação.

Ao professor Paulo Dejalma Zimmer, pela orientação, incentivo e confiança que depositou em meu trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de BioSementes, Fernanda Amaral, Alice, Géri, Guilherme, Ronei, Luiza, Liliane, Fernando, Gaspar, Filipa e Daniela, por esses anos de muito apoio, amizade e excelente convivência.

Às grandes amigas Clarissa, Helen, Katiane, Patrícia, Liziane, Regina, Ana Maria e Miriam, por acreditarem no meu potencial e me apoiarem incondicionalmente.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Sementes, por compartilharem toda sua experiência na área de sementes.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Sementes, pela amizade e todo auxílio na execução do trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas e à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, pela oportunidade de realizar doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Sementes.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

*Semeia um pensamento e colherás um desejo,
Semeia um desejo e colherás a ação,
Semeia a ação e colherás um hábito,
Semeia um hábito e colherás o caráter.*
(Tihamer Toth)

RESUMO

Ferrari, Cibele dos Santos. **Expressão diferencial de genes na germinação do mutante de arroz M3-202 sob baixas temperaturas**. 2008. 52f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Maior parte do arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado no Brasil é da subespécie *Indica*, sensível às baixas temperaturas que ocorrem na Região Sul, principal produtora. Sua estreita base genética tem dificultado a obtenção de cultivares tolerantes ao frio. Uma forma de aumentar a variabilidade genética é por meio de mutações induzidas e seleções genéticas a partir de populações mutantes. Ampliada a variabilidade genética, estudos genéticos e moleculares podem auxiliar na identificação e seleção para a característica desejada. O objetivo deste estudo foi produzir e isolar fragmentos de cDNA expressos numa família mutante de arroz M3-202 em resposta ao frio durante a germinação utilizando a técnica de cDNA/AFLP. Para isto, foram comparados os seguintes genótipos: BRS Firmeza (tolerante ao frio), SCS BRS-113 Tio Taka (sensível ao frio), família mutante M3-202 (tolerante ao frio) e a cultivar BRS-7 Taim (sensível ao frio) a partir da qual a mutante foi originado. As sementes destes genótipos foram submetidas à germinação a 25 °C e 13 °C para verificar a expressão diferencial. Foram isolados os embriões das sementes de cada genótipo após 1, 2, e 3 dias da semeadura para 25 °C e após 4, 8, 11 e 14 dias para 13 °C e extraído o RNA total utilizando o Reagente *Pure Link Plant RNA*. Para a síntese dos cDNAs dupla-fita foi utilizado o Kit *SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis* e as amplificações seletivas foram realizadas utilizando o Kit *AFLP Starter Primer* e os fragmentos de cDNA produzidos foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, revelado em nitrato de prata. Comparando-se os genótipos BRS-7 Taim e M3-202, observou-se fragmentos polimórficos nas duas temperaturas avaliadas, sendo que a 13 °C, houveram 42 fragmentos expressos somente em M3-202. Em relação à BRS Firmeza, a M3-202 apresentou 7 fragmentos de mesmo peso molecular, quando a 13 °C, estes mesmos ausentes em BRS-7 Taim. Os fragmentos diferencialmente expressos mais intensos foram recuperados para futuro sequenciamento e identificação dos genes que se expressem nesta família mutante e que estejam, possivelmente, relacionados com a tolerância ao frio no estágio germinativo.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, mutação, frio, cDNA/AFLP

ABSTRACT

Ferrari, Cibele dos Santos. **Differential gene expression in the rice mutant M3-202 during germination at low temperature**. 2008. 52f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The most rice cultivated in Brazil are from the *Indica* subspecies, which is sensitive at low temperatures that occurs on the South Brazil, the main producer. The close genetic basis of the national cultivars had diffculted to obtain of cold tolerant cultivars. A way to increase the genetic variability is induced mutations and genetic selections from mutant populations. After to improvement the genetic variability, genetical and molecular studies may allow identification and selection desired genotypes. The objective of the study was to produce and isolate express cDNA fragments in the M3-202 rice mutant family in cold response during the germination. The mutant was compared with the following genotypes: BRS Firmeza (cold tolerant), SCS BRS-113 Tio Taka (cold susceptible), and the cultivar BRS-7 Taim (cold susceptible) wild type. The seeds of these genotypes were submitted to the germination at 25 °C and 13 °C to access differential expression. After germination, the embryos were isolated from each genotype at 1, 2, 3 days after sowing to 25 °C and at 4, 8, 11, 14 days to 13 °C, and extracted the total RNA using the *Pure Link Plant RNA Isolation Kit*. For the synthesis of double-strand cDNAs we used the *SuperScriptTM Double-Stranded cDNA Synthesis Kit* followed selective amplifications using the *AFLP Starter Primer Kit*. Polymorphic fragments in the two evaluated temperatures; 42 expressed fragments were identified in the mutant in contrast with the wild type. In relation to BRS Firmeza, the M3-202 presented 7 fragments with the same molecular weight, at 13 °C, those absent in the wild type. The differentially expressed more intense fragments were recovered for subsequent sequencing and expressed genes identification in the mutant family and, possibly, to relate with the cold tolerance in the germination stage in the future studies.

Keywords: *Oryza sativa*, mutation, cold, cDNA/AFLP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: **(A)** RNA total extraído com reagente *Pure Link Plant RNA* visualizado 33 em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Nas canaletas 1 a 6 as sementes germinaram a 25 °C e 7 a 14, a 13 °C: **M**- padrão de peso molecular, **1**- BRS-7 Taim 1^a coleta, **2**- M3-202 1^a coleta, **3**- BRS-7 Taim 2^a coleta, **4**- M3-202 2^a coleta, **5**- BRS-7 Taim 3^a coleta, **6**- M3-202 3^a coleta, **7**- BRS-7 Taim 1^a coleta, **8**- M3-202 1^a coleta, **9**- BRS-7 Taim 2^a coleta, **10**- M3-202 2^a coleta, **11**- BRS-7 Taim 3^a coleta, **12**- M3-202 3^a coleta, **13**- BRS-7 Taim 4^a coleta, **14**- M3-202 4^a coleta. **(B)** *Bulk* de cDNA sintetizado com o Kit *SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis*, visualizado em agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Canaletas: **1**- BRS-7 Taim a 25 °C, **2**- M3-202 a 25 °C, **3**- BRS-7 Taim a 13 °C, **4**- M3-202 a 13 °C.

Figura 2: Representação parcial de géis de poliacrilamida 6% revelados com 35 nitrato de prata. **(A)** Perfil de amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-ACT/M-CTA. **(B)** Perfil de amplificação de cDNA com os utilizando a combinação de iniciadores E-AGG/M-CAG. Canaletas: **1**- BRS-7 Taim a 25 °C, **2**- BRS-7 Taim a 13 °C, **3**- M3-202 a 25 °C, **4**- M3-202 a 13 °C.

Figura 3: Representação parcial de géis de poliacrilamida 6% revelados com 36
nitrato de prata demonstrando ausência de expressão de fragmentos
em BRS-7 TAIM a 25°C. **(A)** Perfil de amplificação de cDNA
utilizando a combinação de iniciadores E-ACT/M-CTG. **(B)** Perfil de
amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-
AGG/M-CTA. Canaletas: **1-** BRS-7 Taim a 25 °C, **2-** BRS-7 Taim a
13 °C, **3-** M3-202 a 25 °C, **4-** M3-202 a 13 °C.

Figura 4: Representação parcial de gel de poliacrilamida 6% revelado com 37
nitrato de prata demonstrando fragmentos polimórficos expressos
pelo genótipo mutante M3-202 a 13 °C, após amplificação de cDNA
utilizando a combinação de iniciadores E-ACC/M-CAT. Canaletas: **1-**
BRS-7 Taim a 25 °C, **2-** BRS-7 Taim a 13 °C, **3-** M3-202 a 25°C, **4-**
M3-202 a 13 °C.

Figura 5: Representação parcial de gel de poliacrilamida 6% revelado com 38
nitrato de prata demonstrando fragmentos de mesmo peso molecular
expressos pelo genótipo mutante M3-202 e BRS Firmeza a 13 °C,
após amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores
E-AAG/M-CAG. Canaletas: **1-** BRS-7 Taim a 25 °C, **2-** BRS-7 Taim a
13 °C, **3-** M3-202 a 25 °C, **4-** M3-202 a 13 °C., **5-** SCS BRS-113 Tio
Taka 25 °C, **6-** SCS BRS-113 Tio Taka 13 °C, **7-** BRS Firmeza 25 °C,
8- BRS Firmeza 13 °C.

Figura 6: Representação parcial de gel de poliacrilamida 6% revelado com 40
nitrato de prata, demonstrando fragmentos diferencialmente
expressos pelos genótipos SCS BRS-113 Tio Taka e Firmeza a 13
°C, após amplificação de cDNA utilizando a combinação de
iniciadores E-AGC/M-CAA. Canaletas: **1-** SCS BRS-113 Tio Taka 25
°C, **2-** SCS BRS-113 Tio Taka 13 °C, **3-** BRS Firmeza 25 °C, **4-** BRS
Firmeza 13 °C.

Figura 7: Representação parcial de géis de poliacrilamida 6% revelados com 41
nitrato de prata demonstrando fragmentos polimórficos para a cultivar
SCS BRS-113 Tio Taka 13 °C, após amplificação de cDNA utilizando
a combinação de iniciadores E-AAG/M-CTT em **(A)** e E-AGG/M-CAA
em **(B)**. Canaletas **1**- BRS-7 Taim a 25 °C, **2**- BRS-7 Taim a 13 °C, **3**-
M3-202 a 25 °C, **4**- M3-202 a 13 °C., **5**- SCS BRS-113 Tio Taka 25
°C, **6**- SCS BRS-113 Tio Taka 13 °C, **7**- BRS Firmeza 25 °C, **8**- BRS
Firmeza 13 °C.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Importância da Cultura do Arroz	16
2.2 Origem, Domesticação e Subespécies	17
2.3 Efeitos das Baixas Temperaturas sob a Germinação	18
2.4 Aspectos do Melhoramento para Tolerância ao Frio	21
2.5 Indução de Mutações no Melhoramento no Aumento da Variabilidade	22
Genética	
2.6 Técnica cDNA/AFLP	24
2.7 Descrição dos genótipos utilizados no estudo	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Material Vegetal	28
3.2 Obtenção do tecido vegetal	29
3.3 Isolamento do embrião	29
3.4 Extração de RNA	30
3.5 Síntese de cDNA	30
3.6 Análise de AFLP	31
3.7 Revelação dos géis e interpretação dos resultados	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
6 CONCLUSÃO	43
7 REFERÊNCIAS	44

1 Introdução

A cultura do arroz (*Oriza sativa* L.) está presente em todos os continentes, destacando-se pela produção e área de cultivo por ser um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico, além de desempenhar papel estratégico no aspecto social. O arroz é considerado o cultivo alimentar de maior importância em diversos países em desenvolvimento, onde é alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas (AZAMBUJA et al., 2005).

No Brasil, é a quarta cultura mais importante em termos econômicos, sendo superado pela produção de soja, cana-de-açúcar e milho (AZAMBUJA et al., 2005). O Estado do Rio Grande do Sul é responsável por 60% da produção nacional (CONAB, 2008), porém, enfrenta dificuldades frente às baixas temperaturas registradas na região durante fases críticas do desenvolvimento da cultura.

Estresses abióticos influenciam o acúmulo de biomassa de forma negativa, uma vez que afetam características fisiológicas e estatura das plantas. Em regiões de clima temperado, o frio pode acarretar esterilidade de espiguetas (GROVER et al., 2001) e interferir na época de semeadura, a qual deve ser definida de modo que as temperaturas mais baixas não incidam com as fases críticas da cultura (SOSBAI, 2007).

A temperatura é um fator abiótico de difícil controle no âmbito de manejo, o que ressalta a necessidade de serem desenvolvidas cultivares geneticamente tolerantes a baixas temperaturas, especialmente no estágio germinativo, contribuindo desta forma, com o estabelecimento de estande da cultura do arroz.

Existem variedades de arroz potencialmente doadoras da característica de tolerância ao frio para cultivares sensíveis, por meio do processo de melhoramento genético, porém, estas pertencem à subespécie *Japonica*. Esta subespécie apresenta características de grãos diferenciadas dos genótipos cultivados no Rio Grande do Sul, além de ter sido relatado um alto grau de esterilidade na geração F1 de cruzamentos

entre cultivares *Indica* e *Japonica*, o que diminui o número de recombinantes obtidos e dificulta a transferência gênica entre essas duas subespécies (CRUZ e MILACH, 2000).

As cultivares produzidas no Brasil atualmente apresentam uma estreita base genética, o que, aliado aos problemas de cruzamentos entre subespécies *Indica* e *Japonica*, torna necessário gerar variabilidade genética além da existente no germoplasma da espécie. Isto pode ser possível por meio de mutações induzidas e/ou seleções genéticas a partir de populações mutadas.

O emprego de agentes mutagênicos sobre sementes tem sido amplamente utilizado para aumentar a variabilidade genética, devido à capacidade dessa técnica em alterar uma ou mais características desejáveis, melhorando assim as cultivares já existentes e desenvolvendo novos genótipos (MALUSZYNSKI, 1998).

Uma vez ampliada a variabilidade genética, estudos genéticos e moleculares podem auxiliar na identificação e seleção de genótipos com a característica desejada. Além disso, o arroz, que é considerado espécie modelo, principalmente em função do tamanho reduzido de seu genoma (400 Mb) (SASAKI et al., 2005), pode contribuir para o estudo genômico de outros cereais devido a conservação de genes relacionados às espécies mais próximas (GALE e DEVOS, 1998).

Seqüências completas de nucleotídeos do genoma de diversos organismos são de conhecimento do meio científico. Um desafio maior será a identificação de todos os genes individuais e as funções das proteínas codificadas por estes genes. Outras técnicas estão sendo utilizadas para relacionar as seqüências de DNA com o produto protéico apropriado (RAVEN et al. 2001). Entretanto, em termos aplicados, há uma grande demanda pela associação de alelos específicos com desempenho fisiológico sob determinadas condições ambientais. Uma técnica muito utilizada para o rápido isolamento de genes relacionados a tecidos ou processos específicos é o cDNA/AFLP. Sua metodologia se baseia no protocolo de AFLP utilizando-se o cDNA (DNA complementar) como DNA alvo para as reações e permitindo a caracterização detalhada da expressão de genes em diferentes processos biológicos (BACHEM, et al., 1996).

Uma análise de mutantes de arroz realizada por FONSECA (2007) selecionou a família M3-202 com desempenho superior em relação ao genótipo que lhe deu origem

(BRS-7 Taim). A comparação do perfil de expressão gênica desse mutante com o genótipo de BRS-7 Taim e com genótipos aqui considerados “controle” (BRS Firmeza e SCS BRS-113 Tio Taka), em condições normais e sob estresse do frio, permitirá o isolamento dos fragmentos de cDNA decorrentes da resposta ao frio.

O objetivo do estudo foi avaliar a expressão diferencial de genes do mutante de arroz M3-202 sob condições de germinação em baixas temperaturas, mediante o emprego da técnica de cDNA/AFLP.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Importância da Cultura do Arroz

Ao longo da história, o arroz tem sido um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, sendo cultivado em todos os continentes. A produção mundial de arroz em 2007 foi de aproximadamente 645 milhões de toneladas produzidas por cerca de 114 países (IRRI, 2008).

Cerca de 96% do arroz produzido no mundo é consumido em países em desenvolvimento, localizados em regiões tropicais e subtropicais. Sua produção tem aumentado nas últimas três décadas, apesar de seu cultivo ter origem em países com extrema pressão populacional e limitadas áreas para plantio (FAO, 2004).

O arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína necessária ao homem e, sendo uma cultura extremamente versátil que se adapta a diferentes condições de solo e clima, é considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo (AZAMBUJA et al., 2005). Em países como Bangladesh, Camboja, Vietnã, Indonésia e Tailândia o arroz chega a fornecer de 50 a 80% do total de calorias consumidas pela população (IRRI, 2008).

A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo de arroz. Assim como na Ásia, o arroz é um produto importante na economia de muitos dos países latino-americanos pelo fato de ser item básico na dieta da população, a exemplo do Brasil, Colômbia e Peru, ou por ser um produto importante no comércio internacional para exportação, como ocorre no Uruguai, Argentina e Guiana, e importação, para Brasil, México e Cuba, entre outros (AZAMBUJA et al., 2005).

O Brasil se destaca como o maior produtor não pertencente ao continente Asiático, encontrando-se entre os dez principais produtores mundiais de arroz. A produção nacional na safra 2007/08 foi de 12,11 milhões de toneladas, superior em 7% à colhida na safra anterior, numa área estimada de 2.880.700 ha. A Região Sul

participa da produção nacional com 70,6%, apresentando como principal estado produtor o Rio Grande do Sul, com uma produção de 7,36 milhões de toneladas (61% da produção nacional). O incremento na produção nacional foi motivado, basicamente, pelo crescimento em 11,8% da área plantada no Rio Grande do Sul (1.066.600 ha) em função da retomada das áreas que deixaram de ser plantadas na safra anterior, aliado ao aumento de 2,6% na produtividade (6.902 kg/ha). O acréscimo de produtividade está relacionado às boas condições pluviométricas ocorridas nos meses que precederam a implantação da cultura, propiciando a normalidade do volume de água das barragens e mananciais (CONAB, 2008).

Estes índices permitem que o Rio Grande do Sul seja considerado estabilizador da safra nacional. Segundo o IBGE (2004), a produção do estado representou 3,1% do Produto Interno Bruto (PIB) e gerou R\$ 175 milhões em Impostos de Circulação de Mercadorias e Serviços (ICMS) e 250 mil empregos no Estado.

2.2 Origem, Domesticação e Subespécies

Acredita-se que o arroz tenha origem no sudeste da Ásia, mais precisamente na região compreendida entre a Índia e Mianmar, onde encontra-se a maior diversidade e onde ocorrem numerosas variedades endêmicas (PEREIRA, 2002).

As mais antigas referências ao arroz são encontradas na literatura chinesa, há cerca de 5.000 anos. Na Europa, o arroz começou a ser cultivado nos séculos VII e VIII, com a entrada dos árabes na Península Ibérica. Foram, provavelmente, os portugueses quem introduziram esse cereal na África Ocidental, e os espanhóis, os responsáveis pela sua disseminação nas Américas. No Brasil, a presença do arroz remete à época do descobrimento, porém a prática da orizicultura de forma organizada e racional aconteceu em meados do século XVIII (EMBRAPA, 2008).

O gênero *Oryza* é o mais diversificado e importante da tribo *Oryzaceae* e engloba cerca de 23 espécies dispersas espontaneamente nas regiões tropicais da Ásia, África e América, sendo duas dessas cultivadas, o *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*. Com o processo evolutivo e a domesticação a que foi submetido ao longo do tempo, surgiram diversos tipos geneticamente distintos do *O. sativa*, os

quais se adaptaram às mais variadas condições agroecológicas no mundo. Assim sendo, a espécie *O. sativa* foi classificada em duas principais subespécies denominadas *Indica* (de distribuição tropical e subtropical), a qual apresenta grãos longos e finos e *Japonica* (ocorre em regiões temperadas), cujos grãos são curtos e arredondados. Posteriormente, foi acrescentada a subespécie *Javanica* (de ocorrência na Indonésia), que possui grãos longos e espessos. Outras características como sensibilidade a temperaturas, resistência à seca e comprimento da raiz são usadas para diferenciar as subespécies de *Oryza* (VAUGHAN et al., 2003).

A maioria dos genótipos de arroz irrigado cultivados atualmente no Rio Grande do Sul pertence ao grupo *Indica*, os quais, em grande parte das vezes, são seleções locais de genótipos introduzidos dos programas do Instituto Internacional de Pesquisa de Arroz (IRRI), nas Filipinas, e do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, ou produto de cruzamentos entre esses mesmos genótipos. Os genótipos tradicionalmente cultivados em sequeiro no Brasil pertencem ao grupo *Japonica* tropical (PINHEIRO, 1999).

2.3 Efeitos das Baixas Temperaturas sob a germinação

A ampla faixa de cultivo do arroz abrange áreas predominantemente tropicais, porém áreas temperadas e subtropicais também são cultivadas, onde temperaturas não favoráveis podem ocorrer em um ou mais estádios de desenvolvimento da planta (MARIOT e MENEZES, 2008; STEINMETZ, et al., 2005; YOSHIDA, 1981; NISHIYAMA, 1976). A incidência de temperaturas baixas sobre o cultivo do arroz é um problema em vários países além do Brasil, dentre os quais Austrália, China, Colômbia, Indonésia, Japão, Coréia, Nepal e Estados Unidos.

Os efeitos da baixa temperatura na produção de arroz são muito complexos e variam de acordo com as propriedades fisiológicas e órgãos das plantas. O estágio de desenvolvimento, a cultivar, os métodos de cultivo e as condições ambientais são fatores que também influem na relação entre temperatura e produção de arroz. (NISHIYAMA, 1976). Em relação ao seu desenvolvimento, a influência de baixas

temperaturas é marcante na germinação, na emergência das plântulas e, principalmente, durante a fase reprodutiva (STEINMETZ, et. al., 2005).

Dentre as regiões produtoras de arroz no Brasil, é no estado do Rio Grande do Sul que ocorrem as maiores quedas de produtividade da cultura frente às baixas temperaturas, particularmente no Litoral Sul e na Campanha, com decréscimos de produção superiores a 25% e, em algumas situações, até 50% (STEINMETZ, et. al., 2005).

O rendimento de grãos do arroz irrigado no Rio Grande do Sul está correlacionado com a razão de insolação dos meses de outubro a março e com o número de dias com temperatura do ar igual ou menor que 15 °C, dos meses de janeiro, fevereiro e principalmente março (KLERING et al., 2008; CARMONA et al., 2002). Entre as principais práticas de manejo na cultura do arroz irrigado, a época de semeadura ocupa papel fundamental na busca de estabilidade no rendimento de grãos (MARIOT e MENEZES, 2008; MAGALHÃES e DURÃES, 2002).

A cultura do arroz não tolera temperaturas excessivamente baixas nem excessivamente altas e sua sensibilidade varia em função da fase fenológica em que a cultura se encontra (STEINMETZ, et al., 2005; LI, 1981). As temperaturas ótimas para o desenvolvimento da cultura do arroz verificadas por Yoshida (1981) variam de 20 a 35 °C para a germinação, de 30 a 33 °C para a floração e de 20 a 25 °C para a maturação.

No estágio de germinação, os sintomas de dano causado pelo frio mais comumente observados são o atraso e a diminuição na porcentagem de germinação. Durante o estágio de plântula, o frio pode provocar atraso no desenvolvimento, redução na estatura e amarelecimento das folhas. No período reprodutivo, os sintomas de dano pelo frio são má exerceção da panícula, esterilidade e manchas nas espiguetas (SOUZA, 1990).

A maior suscetibilidade da espécie à baixa temperatura durante a germinação ocorre na fase subsequente à ativação e crescimento do coleóptilo e radícula. A redução do crescimento do coleóptilo durante esta fase pode ser atribuída ao efeito direto do frio na alongação e divisão celular ou ao efeito indireto de desequilíbrio metabólico (YOSHIDA, 1981).

A germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas são fases críticas na transição bem sucedida de uma semente para uma planta. A semente com baixo conteúdo de água é altamente tolerante às baixas temperaturas, mas reativando-se

o metabolismo, inicia-se o processo de crescimento e desenvolvimento da plântula, tornando-se muito sensível a condições de estresse como baixa temperatura ou baixa umidade (DE LOS REYES et al., 2003).

O processo de germinação ocorre em 3 etapas principais: embebição, processo bioquímico preparatório e emergência (MARCOS FILHO, 2005). A baixa temperatura durante o período inicial de embebição interfere na qualidade fisiológica das sementes. Nesta fase, o frio induz ao aumento do escape de solutos das sementes, como aminoácidos e carboidratos. A razão para isto é que a membrana plasmática passa do estado “líquido-cristalino” para estado de “gel”, ocorrendo contração física e abrindo os canais que aumentam sua permeabilidade, provocando o desbalanceamento iônico. A composição da camada lipídica é apontada como responsável pela tolerância à baixa temperatura; quanto maior grau de insaturação lipídica, maior a tolerância ao frio (MURATA e YAMAYA, 1984).

As mudanças associadas às propriedades da mitocôndria em populações de milho tolerantes e sensíveis ao frio foram avaliadas por Santis et. al. (1999). Quando as plântulas das duas populações cresceram a 14 °C, a membrana interna da mitocôndria da população tolerante apresentou maior porcentagem de ácidos graxos insaturados C18, maior fluidez e maior atividade da enzima citocromo C oxidase do que a população sensível. Também encontraram uma relação positiva entre estas propriedades e a atividade da peroxidase mitocondrial, permitindo à população tolerante reduzir a peroxidação lipídica em relação à suscetível.

De forma geral, pode-se dizer que durante a exposição de plantas a baixas temperaturas, mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos são observadas: modificação dos níveis e atividade de enzimas que participam de várias rotas metabólicas, acúmulo de carboidratos (sacarose, frutose), aminoácidos ou poliaminas e alteração da composição de lipídeos da membrana celular (BARTELS e NELSON, 1994). Determinadas classes de proteínas foram identificadas como tendo sua síntese regulada sob estresse pelo frio, dentre elas as proteínas de choque térmico que podem atuar como chaperonas moleculares, as proteínas anticongelamento, as proteínas de estabilização de membrana e as proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), que também estão associadas ao estresse osmótico (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O mecanismo fisiológico primário envolvido na tolerância ao frio é a conservação da atividade e funcionamento da membrana celular a baixas

temperaturas (BLUM, 1988). O prejuízo dessa atividade em função do frio tem uma implicação em vários processos fisiológicos vegetais, dentre eles a atividade dos plastídios, o funcionamento celular, as relações hídricas e, por fim, o crescimento.

2.4 Aspectos do Melhoramento para Tolerância ao Frio

Um desafio dos programas de melhoramento vegetal para as regiões orizícolas da zona temperada é desenvolver novas cultivares tolerantes às baixas temperaturas e com elevada produtividade. Duas alternativas complementares para incrementar a produtividade têm sido propostas para a América Latina: a) época de semeadura adequada e b) incorporar o potencial de maior rendimento presente no germoplasma elite tropical (*Indica*) (TORRES TORO, 2006).

O IRRI conduz experimentos cooperativos com profissionais da área de melhoramento vegetal do mundo inteiro com os objetivos de encontrar fontes de tolerância, transferir a tolerância ao frio para cultivares semi-anãs de alto rendimento e desenvolver técnicas de teste para avaliar a tolerância ao frio do germoplasma (KANEDA e BEACHELL, 1972). No Brasil, instituições como Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), IRGA (Instituto Riograndense do Arroz), FLAR (*Fondo Latino Americano para Arroz de Riego*) e universidades estão procurando identificar genitores superiores para tolerância ao frio, bem como, melhores métodos de identificação destes genitores (CRUZ, 2003).

Aproximadamente 230.000 acessos de arroz (*Oryza spp*) estão preservados em bancos de germoplasma no mundo inteiro. A base genética do melhoramento da cultura é, no entanto, extremamente estreita. Não se sabe com exatidão o número de cultivares de arroz existentes no mundo, porém, são estimadas mais de 140.000 variedades lançadas. A maior coleção encontra-se no IRRI, onde o “International Rice Genebank” (IRG), criado em 1977, consta atualmente com cerca de 107.000 acessos (IRRI, 2005).

No Brasil, apenas sete ancestrais são responsáveis por 70% da composição gênica das cultivares nos principais estados produtores. No RS, até meados da década de 90, apenas seis ancestrais contribuía com 86% dos genes das variedades mais plantadas (RANGEL et al., 1996). Em estudos para avaliar a

variabilidade de cultivares nacionais, Malone et al. (2006a) também indicam esta situação de alta uniformidade genética.

Os genótipos respondem diferentemente em relação à tolerância ao frio, sendo que, em geral, as cultivares da subespécie *Japonica* são mais tolerantes do que as da subespécie *Indica*. (STEINMETZ, et. al., 2005).

A tolerância ao frio em arroz é uma característica quantitativa complexa controlada por multigenes (LI et. al., 2004), além de apresentar difícil controle experimental do estresse sob condições de campo. A tolerância varia conforme o período de desenvolvimento da planta, sendo que a seleção em apenas um período de desenvolvimento não é suficiente, pois o estresse pode ocorrer tanto no início como no final do ciclo (da germinação até florescimento), dificultando o processo de melhoramento do caráter (CRUZ e MILACH, 2000).

2.5 Indução de Mutações no Melhoramento no Aumento da Variabilidade Genética

Genomas estão sujeitos a fatores mutagênicos, ocorrendo mutações continuamente e ao acaso. Elas são a fonte original da variação genética, sendo responsáveis pela formação de novos alelos na população (BARBIERI, 2003).

Mutações podem ocorrer na natureza espontânea e aleatoriamente em razão de fatores ambientais, porém ocorrem raramente e são de difícil identificação por serem na sua maioria recessivas e deletérias. As mutações também podem ser induzidas, submetendo o material à radiação ou agentes químicos (BORÉM e MIRANDA, 2005).

A variabilidade genética é essencial para qualquer programa de melhoramento que tenha por objetivo selecionar características desejáveis das plantas cultivadas (BORÉM e MIRANDA, 2005). A utilização de agentes indutores de mutações pode ser uma alternativa para incorporação de novos genes de interesse agrônomo à variedade, podendo resultar em genótipos mais estáveis e mais adaptados às condições edafoclimáticas do sul do Brasil (COIMBRA et al., 2005).

Os raios gama são radiações eletromagnéticas ionizantes, que podem penetrar muitos centímetros nos tecidos. Todas as partes das plantas podem ser

irradiadas, mas as sementes são preferidas em muitos trabalhos de indução de mutações devido a fácil manipulação, irradiação pode ser feita em muitos ambientes, onde talvez não sobrevivessem outras partes das plantas; além de poderem ser secas, umedecidas, aquecidas ou congeladas (BORÉM e MIRANDA, 2005). Estudos com diversas espécies têm sido realizados empregando raios gama na obtenção de genótipos com características agronômicas desejáveis (MARTINS et al., 2007; CAMARGO et al., 2005; COIMBRA et al., 2005; SOUZA et al., 2005; ZIMMER, et al., 2003; TULMANN et al., 2001; PANDINI et al., 1997; TULMANN et al., 1994).

Em 2005, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) lançou a cultivar SCS 114 “Ando San”, a primeira cultivar de arroz irrigado obtida no Brasil a partir da seleção de população de mutantes, obtida através de irradiação de sementes com raios gama (ISHIY et al., 2005).

O avanço no desenvolvimento de técnicas de análise genômica impulsionou o melhoramento por mutação devido à possibilidade atual de se avaliar uma porção maior da variabilidade. As principais contribuições das mutações espontâneas são novos genes e recombinações não percebidas em variedades e/ou espécies selvagens. Com o direcionamento dos estudos na geração de mapas moleculares e estudos de ação gênica, os genótipos mutantes ganharam ainda mais importância, pois se constituem em material básico para esses trabalhos (MALUSZYNSKI, 1998).

A análise de mutantes tem sido um poderoso método para a compreensão dos mecanismos de resposta a estresses, podendo ser utilizado para caracterizar a tolerância a injúrias causadas pelo frio (LEE et al., 2004). Mutantes da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* (L.) têm sido amplamente estudados por diversos pesquisadores. Gilmour e Thomashow (1991), avaliaram a expressão de genes regulados pelo frio em mutantes ABA-deficientes e ABA-insensíveis derivados de *A. thaliana*. Estudos de Lee et al. (1999), com mutantes desta espécie, tolerantes ao frio, indicaram um regulador negativo da transdução de sinais a baixas temperaturas. Tokuhisa et al. (1997) utilizaram mutantes para identificar genes que se expressavam a 5 °C. Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (1994), identificaram dois genes localizados próximos no genoma de *A. thaliana* e que são diferentemente induzidos sob condições de estresse.

2.6 Técnica cDNA/AFLP

As respostas biológicas às condições ambientais, temporal e espacialmente, são controladas pela expressão de determinados genes. Para melhor compreender estes processos, uma variedade de técnicas moleculares está atualmente disponível para identificação e clonagem de genes diferencialmente expressos. Uma delas, utilizada no estudo de perfis de expressão de genes, a cDNA/AFLP (DNA complementar/Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), apresenta-se como um método robusto e reprodutível para a detecção de transcritos diferencialmente expressos em diversos sistemas experimentais (BACHEM et al., 1998).

A metodologia dos marcadores AFLP foi proposta por Vos et al. (1995) e baseia-se na amplificação do DNA via PCR para detectar diferenças em um conjunto de fragmentos selecionados e digeridos com enzima de restrição.

O procedimento apresenta 4 etapas principais: i) digestão do DNA genômico com enzimas de restrição (uma de corte raro e outra de corte freqüente); ii) ligação de adaptadores específicos às extremidades dos fragmentos de restrição; iii) preamplificação e amplificações seletivas, utilizando *primers* complementares aos adaptadores; e iv) eletroforese em géis de poliacrilamida com posterior coloração dos fragmentos (MALONE e ZIMMER, 2005).

O polimorfismo gerado por AFLP resulta de mutações pontuais, inversões, deleções e inserções no DNA que levam à perda ou ganho de um sítio de restrição reconhecidos pelas enzimas utilizadas ou pela alteração da seqüência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários nos terminais 3' dos iniciadores utilizados na reação de PCR (CAVALLI, 2003).

Os marcadores AFLP apresentam algumas vantagens importantes sobre os demais marcadores, dentre elas, a de produzir um grande número de fragmentos os quais são gerados e visualizados em um único gel, proporcionando uma amostragem ampla e simultânea de um genoma. Esta técnica apresenta grande poder de detecção de variabilidade genética, pois explora o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição e a ocorrência ou não de amplificação a partir de seqüências arbitrárias e não requer informação prévia da seqüência de DNA (CAVALLI, 2003).

A técnica de cDNA/AFLP proposta por Bachem et al. (1996), se baseia no protocolo padrão de AFLP utilizando cDNA como DNA alvo para as reações.

O cDNA é obtido pela extração de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) de uma célula e, a partir delas, é sintetizada uma cópia de DNA complementar. Destituídos de seqüências de íntrons e intergênicas, estes mRNAs representam apenas uma pequena percentagem do genoma total (cerca de 1 a 3% em eucariotos). Entretanto, eles contêm valiosa informação da atividade do gene o qual codifica para proteínas expressas em tecidos específicos e responsáveis pela identidade deste tecido (DUNWELL et al., 2001). A reação de síntese de cDNA é catalisada pela enzima transcriptase reversa, a qual sintetiza uma cadeia molde de RNA. Após, as moléculas de DNA fita simples são convertidas em moléculas fita dupla pela DNA polimerase (PASSAGLIA e ZAHA, 2003).

No procedimento de cDNA/AFLP, o conjunto de cDNAs sintetizados é digerido com duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte freqüente, e os fragmentos gerados são ligados aos adaptadores específicos de cada enzima. Os fragmentos de cDNA ligados são pré-amplificados. A pré-amplificação é realizada, normalmente, com iniciadores não-seletivos, ou seja, contendo apenas a seqüência do adaptador sem adicionar nucleotídeos aleatórios. Na próxima etapa é realizada uma amplificação seletiva, onde se utiliza dois iniciadores diferentes. Um consiste na seqüência do adaptador da enzima de corte raro acrescida de um ou mais nucleotídeos aleatórios na extremidade 3' e outro na seqüência do adaptador da enzima de corte freqüente seguida dos nucleotídeos arbitrários. O uso desses iniciadores seletivos reduz a quantidade de fragmentos de DNA. Do conjunto de fragmentos gerados com a digestão, apenas aqueles que contêm os nucleotídeos seletivos flanqueando o sítio de restrição são amplificados. Esta técnica de análise de RNA permite a caracterização detalhada da expressão de genes em diferentes processos biológicos (CAIXETA et al., 2006).

O cDNA/AFLP tem se mostrado eficiente para isolar genes diferencialmente expressos, tendo sido utilizado com sucesso por diversos pesquisadores. Mao, et al. (2004) identificaram genes regulados pelo alumínio em arroz; Leymarie, et al. (2007) verificaram transcritos envolvidos na germinação e dormência em cevada; Yang, et al. (2003) isolaram genes expressos em arroz sob estresse hídrico; Aoki, et al. (2005) isolaram e caracterizaram gene que codifica para proteína tipo zíper de leucina induzida por estresse salino em soja; Liqiong, et al. (2005) isolaram 5

fragmentos de genes do estresse ao frio em *Volvariella volvaceae*; Chen, et al. (2001) verificaram a expressão diferencial de genes relacionados a polinização e fertilização em arroz; Rodríguez, et al. (2006) isolaram genes relacionados ao estresse pelo déficit hídrico em uma variedade de arroz tolerante à seca; Chen, et al. (2003) isolaram gene diferencialmente expresso entre duas linhas de trigo mutantes sob condições normais e sob estresse salino, identificando vários genes relacionados a esse estresse; Suprunova, et al. (2007) identificaram um gene (Hsdr⁴) envolvido na tolerância ao estresse hídrico e cevada pela expressão diferencial de cevada selvagem e a cultivada.

2.7 Descrição dos genótipos utilizados no estudo

A cultivar BRS-7 Taim pertence ao grupo moderno (ou filipino), caracterizada por plantas de folhas curtas e eretas, porte inferior a 100 cm e alta capacidade de afilamento. Esta cultivar é descendente da seleção de planta híbrida (cruzamento desconhecido), encontrada na área experimental de melhoramento de arroz do CPATB (Centro de Pesquisa Agropecuária Terras Baixas) de 1984-85. Com ciclo biológico mediano (na Zona Sul do Estado, com cerca de 125-130 dias da emergência à completa maturação), a cultivar BRS-7 Taim apresenta boa produtividade e grãos com elevado rendimento industrial. Sob condições de campo, revela melhor reação à brusone que os demais genótipos do tipo moderno atualmente existentes (APASSUL, 2008). Entretanto, dada a sensibilidade ao frio e o ciclo semitardio, esta cultivar não admite sementeiras tardias (FAGUNDES et al., 2005).

A cultivar SCS BRS-113 Tio Taka é oriunda da população CNA-IRAT 4 que foi sintetizada pela Embrapa Arroz e Feijão e pelo Institut de Recherches Agronomiques Tropicales (IRAT), da França, por meio do intercruzamento de 10 linhagens da subespécie *Indica*. Nove linhagens foram utilizadas como parentais masculino em cruzamento com uma linhagem fonte de machoesterilidade genética, derivada da cultivar IR 36, por mutação (RANGEL, 2007). É uma cultivar de ciclo longo, alto potencial de produtividade, porte baixo, resistente ao acamamento, alta capacidade de perfilhamento, ampla estabilidade de produção, alto rendimento industrial e boas

qualidades culinárias. Esta cultivar pode ser cultivada em todas as regiões produtoras de Santa Catarina, desde que sejam efetuados testes preliminares de adaptabilidade (FAGUNDES et al., 2005).

A cultivar BRS Firmeza é originada do cruzamento múltiplo realizado na Embrapa Clima Temperado. Pertence ao grupo de plantas moderno/americano, de pouca capacidade de perfilhamento, colmos vigorosos e fortes, com altura média de 77 cm. Apresenta ciclo 120 dias, grãos do tipo longo-fino e rendimento industrial geralmente médio. O baixo grau de esterilidade demonstrado na fase experimental no Rio Grande do Sul indica que a cultivar tem certo grau de tolerância genética ao frio na fase reprodutiva. Em relação a estresses, a cultivar apresenta intermediária reação à brusone, moderada suscetibilidade à rizoctonia, intermediária reação à toxicidade por ferro, moderada tolerância à salinidade do solo e da água, moderada tolerância ao frio e suscetibilidade à bicheira da raiz e à broca do colmo (FAGUNDES et al., 2005).

A família mutante de terceira geração 202 (M3-202) foi selecionada a partir da população de mutantes gerada através de mutação induzida por raios gama sobre sementes da cultivar BRS-7 Taim. Esta família demonstrou uma tolerância ao frio nos períodos germinativo e reprodutivo significativamente superior a BRS-7 Taim, apresentando comprimento médio de coleóptilo de 12,9 mm (FONSECA, 2007).

3 Material e Métodos

Para produzir e isolar os fragmentos de cDNA expressos no mutante de arroz M3-202 (FONSECA, 2007) em resposta ao frio, utilizou-se a estratégia de comparar seus cDNAs com os cDNAs gerados em genótipos controle mediante germinação sob duas temperaturas contrastantes, 13 e 25 °C.

O experimento para germinação das sementes a 25 °C e 13 °C foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia/FAEM/UFPel. Os procedimentos de isolamento de embriões, extração de RNA, síntese de cDNA e análise de AFLP foram executados no Laboratório de BioSementes, localizado no mesmo departamento.

3.1 Material Vegetal

A expressão dos genes do genótipo mutante M3-202 (FONSECA, 2007) foi comparada com o perfil de expressão dos seguintes genótipos: BRS Firmeza como genótipo tolerante ao frio; cultivar SCS BRS-113 Tio Taka, suscetível ao frio e cultivar BRS-7 Taim, a qual deu origem à família mutante.

As sementes da cultivar SCS BRS-113 Tio Taka foram cedidas pela EPAGRI; as sementes das cultivares BRS Firmeza e BRS-7 Taim foram obtidas junto ao banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado e a família mutante M3-202 foi obtida junto ao banco de sementes do próprio Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da UFPel.

3.2 Obtenção do tecido vegetal

Sementes das cultivares SCS BRS-113 Tio Taka, BRS Firmeza, BRS-7 Taim e da família mutante M3-202 foram semeadas entre folhas de papel germitest umedecidas previamente com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso seco do papel e colocadas em caixas de acrílico tipo gerbox. Para a temperatura de 25 °C, foram semeadas cerca de 50 sementes de cada genótipo em gerbox e acondicionadas em câmara de germinação; para a temperatura de 13 °C, foram utilizadas cerca de 80 sementes de cada genótipo e os gerbox foram levados à câmara tipo *Biochemical Oxygen Demand* (BOD).

Foram realizadas 3 coletas do material a 25 °C (após 1, 2 e 3 dias da semeadura), enquanto que para o material a 13 °C realizou-se 4 coletas (aos 4, 8, 11 e 14 dias após a semeadura). Tal procedimento foi necessário visto que temperaturas baixas retardam a atividade enzimática e, conseqüentemente, o processo de germinação; aumentando-se o período e o número de coletas do material a 13 °C, buscou-se uma equivalência com o estágio de desenvolvimento em que as sementes a 25 °C se encontravam quando foram coletadas.

3.3 Isolamento do embrião

Para a realização deste estudo, foram isolados 45 embriões das sementes mantidas a 25 °C (20, 15 e 10 sementes na 1^o, 2^o e 3^o coleta, respectivamente) e 65 embriões a 13 °C (20, 20, 15 e 10 sementes na 1^o, 2^o, 3^o e 4^o coleta, respectivamente) para cada cultivar, sendo que nas últimas coletas era possível observar a radícula e o coleóptilo. Com o auxílio de uma lâmina, realizou-se a incisão do tegumento e isolou-se o embrião, que foi imediatamente colocado em gelo. O processo foi executado com material esterilizado, tratado com água ultrapura contendo 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) e em ambiente asséptico, livre de RNases e da contaminação de RNAs externos. Após o isolamento, os embriões foram colocados em tubos estéreis, identificados e armazenados em freezer (-20 °C) até a extração do RNA total.

3.4 Extração de RNA

Todos os procedimentos que envolveram a obtenção e posterior manipulação do RNA total foram executados em ambiente asséptico, em câmara de fluxo laminar e/ou capela de exaustão, utilizando-se material esterilizado e todos reagentes foram preparados com água ultrapura tratada com 0,01% de DEPC.

O RNA total foi isolado utilizando o Reagente *Pure Link Plant RNA* (Invitrogen) de acordo com as recomendações de uso do fabricante. Para a extração, os embriões de cada coleta foram macerados em nitrogênio líquido e adicionado o Reagente *Pure Link Plant RNA*. Utilizou-se NaCl 5M e clorofórmio para facilitar a separação das fases aquosa e orgânica e remoção de contaminantes. Na última etapa, precipitou-se o RNA total presente na fase aquosa utilizando isopropanol. O *pellet* de RNA total foi dissolvido em 20 μ L de água ultrapura tratada com 0,01% de DEPC e armazenado em freezer a -20 °C até a síntese de cDNA.

A integridade e quantidade do RNA extraído foram estimadas por meio de visualização em gel de agarose 1% em TBE 1X. A eletroforese foi conduzida utilizando tampão TBE 1X, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Três μ L de RNA foram preparados com 2 μ L de tampão de carga e aplicados em gel de agarose 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídio à concentração de 0,2 μ g/mL. Após a eletroforese, os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e as imagens digitalizadas utilizando câmera fotográfica.

3.5 Síntese de cDNA

Após a extração do RNA total, foram feitos *bulks* para cada genótipo e temperatura de germinação, utilizando 3 μ L de RNA em água DEPC de cada coleta a 25 °C, totalizando 9 μ L e 2,5 μ L de cada coleta a 13 °C, totalizando 10 μ L.

Para a síntese dos cDNAs dupla-fita, foi utilizado o Kit *SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis* (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante. A primeira etapa deste procedimento é a síntese da primeira fita utilizando iniciador oligo dT, DTT, mix de dNTPs e a enzima transcriptase reversa. A posterior síntese

da segunda fita de cDNA é realizada em reação com mix de dNTPs, as enzimas DNA ligase, DNA polimerase e RNase, e após, com T4 DNA polimerase. Para isolamento do cDNA, utilizou-se EDTA 0,5 M, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1, acetato de amônio 7,5 M e etanol para obter cDNA íntegro e sem contaminações. O *pellet* obtido foi dissolvido em 6 µL de água DEPC.

A eficiência da obtenção dos cDNAs e a qualidade dos fragmentos foram aferidas em eletroforese conduzida em gel de agarose 1% em TBE 1X de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Um µL de cDNA foi aplicado no gel, corado com brometo de etídio à concentração de 0,2 µg/mL, analisado em transiluminador sob luz ultravioleta e as imagens digitalizadas utilizando câmera fotográfica.

3.6 Análise de AFLP

Para execução dessa técnica, utilizou-se o Kit *AFLP Starter Primer* (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Foram realizadas as etapas de digestão do cDNA com enzimas de restrição *EcoR* I e *Mse* I, e ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos de cDNA gerados pela clivagem, os quais possuem seqüências complementares aos iniciadores utilizados na reação de PCR. Após, foi realizada a pré-amplificação dos fragmentos de restrição com apenas uma base seletiva no iniciador (*EcoR* I = A e *Mse* I + C). O produto da pré-amplificação foi utilizado como DNA molde para as reações de amplificação seletiva, utilizando três bases seletivas. Testou-se 56 combinações de iniciadores disponíveis no kit.

3.7 Revelação dos géis e interpretação dos resultados

A visualização dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, revelado em nitrato de prata conforme metodologia descrita por Bleider (1982).

Foram avaliados os fragmentos diferencialmente expressos entre os diferentes genótipos e entre as duas temperaturas (presença ou ausência a um determinado peso molecular dos fragmentos). Os fragmentos que se apresentaram em alta intensidade e boa resolução foram recuperados do gel, para serem reamplificados, clonados e seqüenciados em estudos futuros.

5 Resultados e Discussão

O RNA total extraído com o Reagente *Pure Link Plant RNA* dos embriões de sementes germinadas pode ser observado na figura 1A. Estima-se, através da maior intensidade das bandas, que o rendimento nas extrações de embriões das sementes mantidas a 25 °C foi superior ao observado a 13 °C para todos os genótipos estudados. Este desempenho pode ser decorrente da maior atividade metabólica proporcionada pela elevada temperatura, aumentando assim, a síntese de RNA.

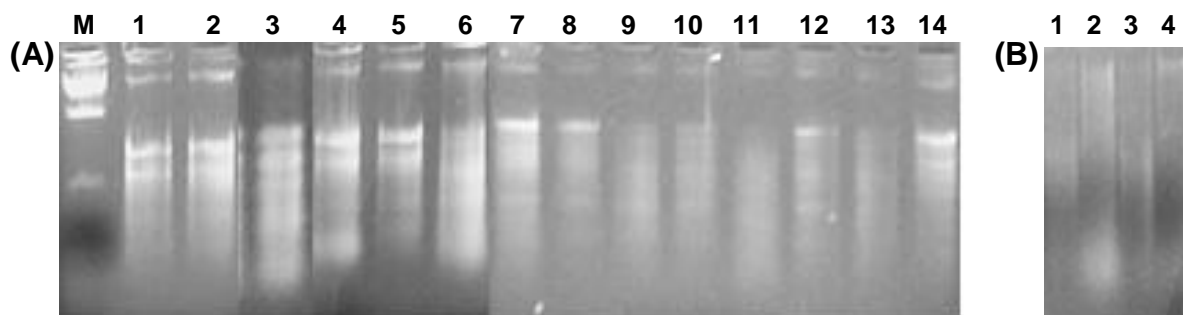


Figura 1: **(A)** RNA total extraído com reagente *Pure Link Plant RNA* visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Nas canaletas 1 a 6 as sementes germinaram a 25 °C e 7 a 14, a 13 °C: **M**- padrão de peso molecular, **1**- BRS-7 Taim 1^a coleta, **2**- M3-202 1^a coleta, **3**- BRS-7 Taim 2^a coleta, **4**- M3-202 2^a coleta, **5**- BRS-7 Taim 3^a coleta, **6**- M3-202 3^a coleta, **7**- BRS-7 Taim 1^a coleta, **8**- M3-202 1^a coleta, **9**- BRS-7 Taim 2^a coleta, **10**- M3-202 2^a coleta, **11**- BRS-7 Taim 3^a coleta, **12**- M3-202 3^a coleta, **13**- BRS-7 Taim 4^a coleta, **14**- M3-202 4^a coleta. **(B)** Bulk de cDNA sintetizado com o Kit *SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis*, visualizado em agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Canaletas: **1**- BRS-7 Taim a 25 °C, **2**- M3-202 a 25 °C, **3**- BRS-7 Taim a 13 °C, **4**- M3-202 a 13 °C.

Conforme observado na figura 1B, foi possível sintetizar cDNAs utilizando o Kit *SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis*, a partir dos bulks de RNA total de cada genótipo em cada temperatura, sem a necessidade do prévio isolamento do RNA mensageiro, demonstrando que o mesmo apresentou qualidade suficiente para tal procedimento. A qualidade e integridade do RNA extraído são pontos críticos para obtenção de cDNA representativo dos genes expressos (MERTZ et al., 2008; PORTILLO et al., 2006), provavelmente mais importantes que o rendimento.

Na etapa de amplificação seletiva, momento em que foram testadas 56 combinações de iniciadores disponíveis no Kit *AFLP Starter Primer*, 13 destes não

apresentaram amplificação e em 43 combinações foram observados fragmentos polimórficos de cDNA em relação às temperaturas e genótipos avaliados.

Na comparação dos perfis produzidos em gel de poliácridamida para o genótipo BRS-7 Taim e para a família M3-202, observou-se que tanto as sementes geminadas a 25 °C quanto a 13 °C apresentaram expressão diferencial de genes (Figura 2), sendo que 26 combinações de iniciadores produziram fragmentos polimórficos e em 17 combinações os fragmentos foram monomórficos para estes dois genótipos. Isto confirma a eficiência da radiação gama no incremento da variabilidade genética através da indução de mutação e o potencial da técnica de AFLP em detectar esta variabilidade, observada pela modificação na expressão genética da família M3-202, nestas condições.

A partir do cDNA obtido de sementes mantidas à temperatura de 25 °C, foram identificados 20 fragmentos polimórficos entre BRS-7 Taim e a família mutante M3-202 resultantes de 14 combinações de iniciadores utilizados na amplificação seletiva; 9 destes fragmentos foram expressos somente por BRS-7 Taim, indicando que, provavelmente, a radiação provocou a inibição ou inativação de um ou mais genes na família mutante, em relação a cultivar que lhe deu origem. Um desses fragmentos polimórficos é ilustrado pela figura 2A, onde na canaleta 1 ele está presente no perfil de amplificação para BRS-7 Taim, enquanto na canaleta 3, a qual representa o perfil de amplificação do genótipo mutante, o mesmo está ausente.

A irradiação pode ter provocado um mau funcionamento do sistema celular que replica ou repara o DNA, pode ter interferido diretamente sobre as bases do DNA afetando a atividade da proteína transcrita (PASSAGLIA, 2003), ou ainda ter atingido elementos reguladores envolvidos na expressão de genes da cultivar BRS Taim. Tais hipóteses deverão ser testadas após a clonagem e seqüenciamento dos fragmentos identificados neste estudo.

Por outro lado, 3 fragmentos foram observados somente para amplificação de cDNA da família mutante M3-202, sugerindo que a radiação também induziu a expressão de genes não expressos no genótipo BRS-7 Taim durante a germinação. Um desses fragmentos, observado na figura 2B (canaletas 3 e 4), poderia ser resultado de uma expressão não influenciada pelas condições ambientais, uma vez que está sendo expresso nas duas temperaturas para a família mutante.

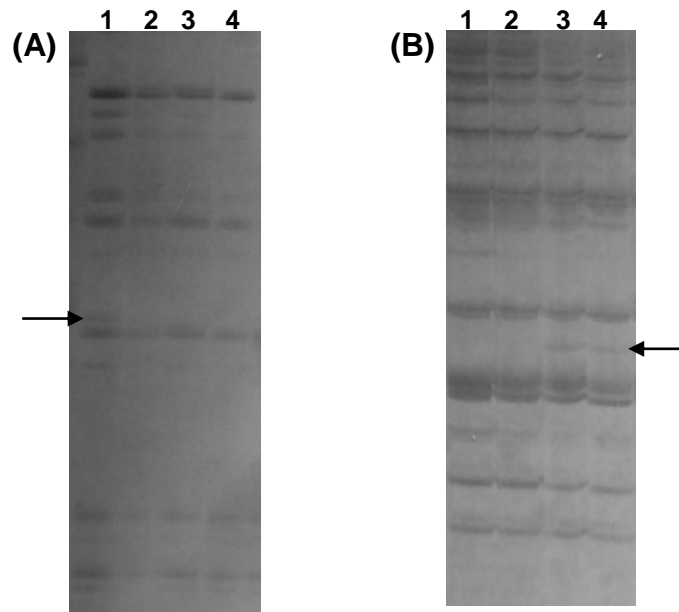


Figura 2: Representação parcial de géis de poliacrilamida 6% revelados com nitrato de prata. **(A)** Perfil de amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-ACT/M-CTA. **(B)** Perfil de amplificação de cDNA com os utilizando a combinação de iniciadores E-AGG/M-CAG. Canaletas: 1- BRS-7 Taim a 25 °C, 2- BRS-7 Taim a 13 °C, 3- M3-202 a 25 °C, 4- M3-202 a 13 °C.

Conforme observa-se nas figuras 3A e 3B, alguns fragmentos expressos para o genótipo BRS-7 Taim para sementes mantidas a 13 °C (canaleta 2), estão ausentes neste genótipo a 25 °C (canaleta 1). O mesmo não ocorre no perfil eletroforético que representa a família mutante M3-202, no qual observa-se os fragmentos para as duas temperaturas de germinação utilizadas no estudo, 13 e 25 °C. Ou seja, produtos da expressão gênica induzida a 13°C no genótipo BRS-7 Taim estão sendo expressos na família M3-202 em temperaturas de germinação altas e baixas. Este padrão ocorreu em 5 combinações de iniciadores, que geraram 8 fragmentos polimórficos.

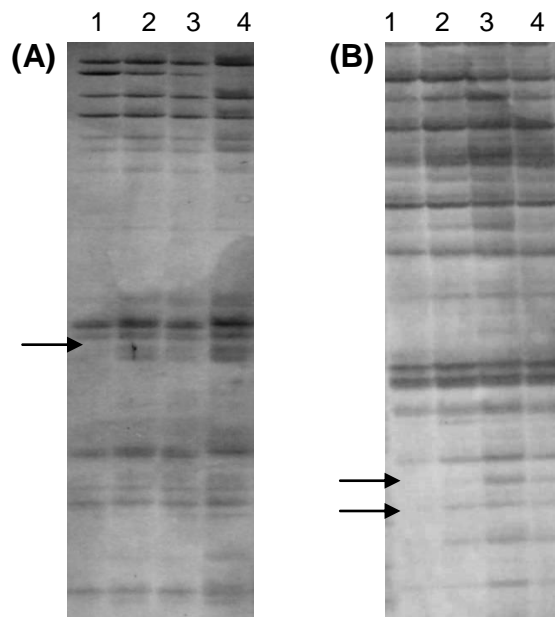


Figura 3: Representação parcial de géis de poliacrilamida 6% revelados com nitrato de prata demonstrando ausência de expressão de fragmentos em BRS-7 TAIM a 25°C. **(A)** Perfil de amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-ACT/M-CTG. **(B)** Perfil de amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-AGG/M-CTA. Canaletas: 1- BRS-7 Taim a 25 °C, 2- BRS-7 Taim a 13 °C, 3- M3-202 a 25 °C, 4- M3-202 a 13 °C.

As mutações resultam da mudança da estrutura de um gene, podendo afetar regiões codificadoras ou reguladoras; regiões promotoras e outros elementos reguladores podem sofrer mutações, e vão eventualmente alterar a expressão genética (LODISH et al., 2002). Os processos celulares em eucariotos são fortemente regulados, existindo pontos principais de controle da expressão gênica: a ativação da estrutura do gene, a iniciação da transcrição, o processamento do transcrito e, finalmente, a tradução do mRNA (CHAVES, 2006). O nível mais importante da regulação é o início da transcrição. A partir de determinados sinais, sequências regulatórias são reconhecidas por fatores proteicos, possibilitando a ativação de um gene ou um grupo de genes, havendo a transcrição (ZAHA, 2003).

Vários sinais internos são exigidos para coordenar a expressão gênica durante o desenvolvimento e para capacitar a planta a responder aos sinais ambientais. Tais agentes sinalizadores internos (assim como os externos) tipicamente promovem seus efeitos por meio de sequencias de reações bioquímicas, denominadas “rotas de transdução de sinais”, que ampliam o sinal original e essencialmente resultam na ativação ou repressão de genes (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Martins (2007) verificou a formação de famílias de arroz mutantes tolerantes, intermediárias e sensíveis ao frio quando avaliou esta tolerância em famílias M4, durante o período de germinação. A variação entre essas famílias sugere que a indução de mutação, que atua de forma aleatória silenciando diferentes genes ou elementos ativos no genoma, pode atingir genes regulatórios ou estruturais envolvidos no metabolismo inicial da germinação.

Quando os genótipos BRS-7 Taim e a família mutante M3-202 germinaram a 13 °C, pôde-se observar 42 fragmentos de cDNA presentes em M3-202 e ausentes no genótipo que lhe deu origem, por meio de 24 combinações de iniciadores utilizados na análise de AFLP (Figura 4). Esta quantidade de fragmentos polimórficos sugere que vários genes estão sendo expressos pelo genótipo mutante M3-202 a 13 °C e não no genótipo BRS-7 Taim a esta mesma temperatura.

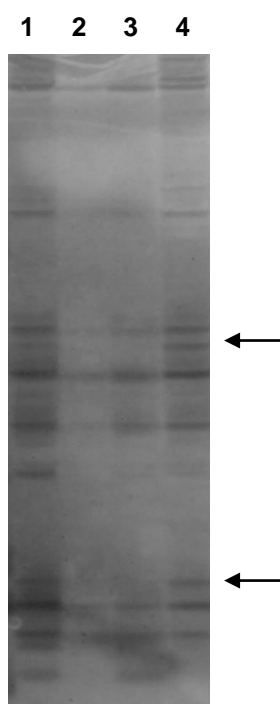


Figura 4: Representação parcial de gel de poliacrilamida 6% revelado com nitrato de prata demonstrando fragmentos polimórficos expressos pelo genótipo mutante M3-202 a 13 °C, após amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-ACC/M-CAT. Canaletas: 1- BRS-7 Taim a 25 °C, 2- BRS-7 Taim a 13 °C, 3- M3-202 a 25°C, 4- M3-202 a 13 °C.

Apesar do pouco conhecimento a respeito do estágio germinativo em arroz, a existência de diferentes mecanismos fisiológicos envolvidos na tolerância ao frio indica que ao longo da fase de germinação, diferentes processos podem estar

atuando como mecanismos de tolerância (CRUZ e MILACH, 2004), resultantes da expressão de diferentes genes. Estudos anteriores relatam que a resposta às baixas temperaturas é complexa e certamente controlada por mais de um gene (ANDAYA e MACKILL, 2003; VISWANATHAN e ZHU, 2002; CRUZ e MILACH, 2000; BARTELS e NELSON, 1994).

Neste estudo, avaliou-se os padrões de bandas representando fragmentos amplificados de mesmo peso molecular entre a família mutante M3-202 (Figura 5, canaleta 4) e a cultivar BRS Firmeza a 13 °C (Figura 5, canaleta 8), e que não fossem expressos em BRS-7 Taim e SCS BRS-113 Tio Taka, a esta mesma temperatura (Figura 5, canaleta 6). Foram observados 7 fragmentos polimórficos obtidos através de 4 combinações de iniciadores na amplificação seletiva. Uma vez que a cultivar BRS Firmeza é descrita como moderadamente tolerante ao frio, estes fragmentos podem estar relacionados com a expressão de genes importantes para esta característica.

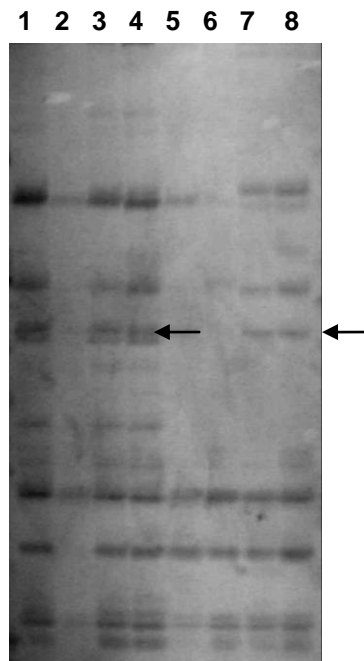


Figura 5: Representação parcial de gel de poli-acrilamida 6% revelado com nitrato de prata demonstrando fragmentos de mesmo peso molecular expressos pelo genótipo mutante M3-202 e BRS Firmeza a 13 °C, após amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-AAG/M-CAG. Canaletas: 1- BRS-7 Taim a 25 °C, 2- BRS-7 Taim a 13 °C, 3- M3-202 a 25 °C, 4- M3-202 a 13 °C., 5- SCS BRS-113 Tio Taka 25 °C, 6- SCS BRS-113 Tio Taka 13 °C, 7- BRS Firmeza 25 °C, 8- BRS Firmeza 13 °C.

Os fragmentos mais intensos e de boa resolução foram recuperados do gel de poliacrilamida para posterior reamplificação e sequenciamento, possibilitando, num futuro próximo, a identificação dos genes que se expressem nesta família mutante e que estejam, possivelmente, relacionados com a tolerância ao frio no estágio germinativo.

O processo de desenvolvimento de tolerância ao frio envolve a síntese de várias proteínas diferentes que se acumulam durante a aclimação ao frio, como resultado da mudança na expressão gênica (GUY, 1999). Rabbani et al. (2003) identificaram 36 genes induzíveis pelo frio em arroz. Por homologia, estes genes foram classificados em dois grupos conforme seu produto: 1º) proteínas funcionais ou que provavelmente tem alguma função na tolerância ao estresse, como proteínas *LEA*, proteínas *COR* envolvidas na aclimação ao frio (muitas codificam polipeptídeos hidrolíticos, os quais hipoteticamente desempenham papel de proteção das células à baixa temperatura, entre outras; e 2º) Proteínas regulatórias que são fatores de proteínas envolvidas na regulação do sinal de tradução e expressão de genes que provavelmente funcionam em resposta ao estresse, podendo ser do tipo dedo de zinco, família do motivo zíper de leucina, proteínas quinases, fosfatases e enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolípidos.

Considerando-se as cultivares SCS BRS-113 Tio Taka e BRS Firmeza, descritas como sensível e tolerante ao frio, respectivamente, avaliou-se o polimorfismo onde fragmentos eram expressos pelas sementes da cultivar BRS Firmeza, nas duas temperaturas, e ausentes para SCS BRS-113 Tio Taka somente a 13 °C (Figura 6). Após a amplificação seletiva, 32 combinações produziram 172 fragmentos diferencialmente expressos, sugerindo que vários genes continuam sendo expressos pelo genótipo BRS Firmeza quando a germinação ocorre a baixas temperaturas (canaleta 4), mas não pela SCS BRS-113 Tio Taka (canaleta 2); genes estes, provavelmente, relacionados a sua tolerância ao frio.

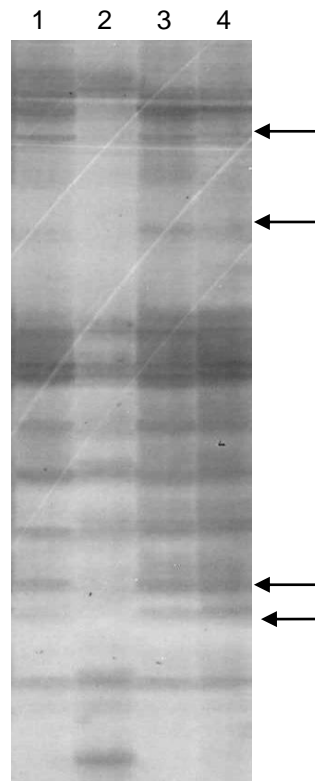


Figura 6: Representação parcial de gel de poliacrilamida 6% revelado com nitrato de prata, demonstrando fragmentos diferencialmente expressos pelos genótipos SCS BRS-113 Tio Taka e Firmeza a 13 °C, após amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-AGC/M-CAA. Canaletas: 1- SCS BRS-113 Tio Taka 25 °C, 2- SCS BRS-113 Tio Taka 13 °C, 3- BRS Firmeza 25 °C, 4- BRS Firmeza 13 °C.

De um modo geral, o padrão de bandas polimórficas mais frequentemente observado neste estudo foi aquele em que a cultivar SCS BRS-113 Tio Taka não expressava fragmentos a 13°C, enquanto nos demais genótipos estavam presentes (Figura 7, canaleta 6). Este desempenho era esperado pois, dentre os genótipos estudados, a cultivar SCS BRS-113 Tio Taka é o mais sensível a baixas temperaturas que, como observado, inibem a expressão de genes no estágio germinativo.

A cultivar SCS BRS-113 Tio Taka é derivada de seleção recorrente, formada por uma combinação de genes de diferentes pais que representaram sua base populacional, sendo esperado que seja a cultivar geneticamente mais divergente entre as freqüentemente usadas comercialmente para arroz irrigado no país (RANGEL et al., 2007).

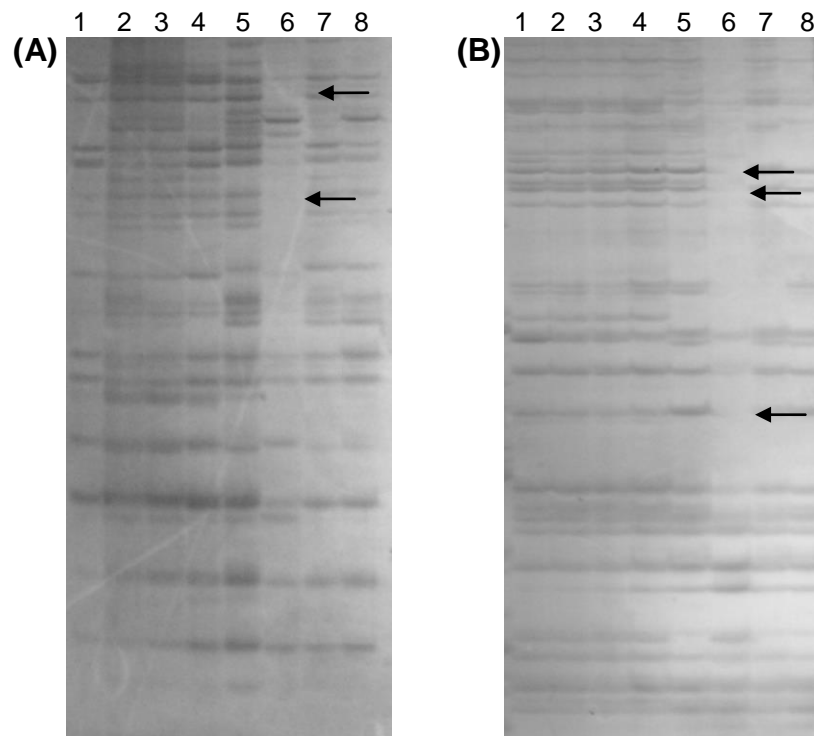


Figura 7: Representação parcial de géis de poliacrilamida 6% revelados com nitrato de prata demonstrando fragmentos polimórficos para a cultivar SCS BRS-113 Tio Taka 13 °C, após amplificação de cDNA utilizando a combinação de iniciadores E-AAG/M-CTT em (A) e E-AGG/M-CAA em (B). Canaletas 1- BRS-7 Taim a 25 °C, 2- BRS-7 Taim a 13 °C, 3- M3-202 a 25 °C, 4- M3-202 a 13 °C., 5- SCS BRS-113 Tio Taka 25 °C, 6- SCS BRS-113 Tio Taka 13 °C, 7- BRS Firmeza 25 °C, 8- BRS Firmeza 13 °C.

6. Considerações Finais

Os fragmentos de cDNA diferencialmente expressos pela família mutante M3-202 e por BRS Firmeza a 13 °C que apresentaram bandas no gel de poliacrilamida com forte intensidade e boa resolução, foram isolados. Após a reamplificação e sequenciamento destes fragmentos, a análise *in silico* por meio de bancos de dados permitirá a identificação dos possíveis genes envolvidos e, posteriormente, de enzimas que, potencialmente, participem do processo de germinação a baixas temperaturas nestes dois genótipos. Identificando-se as possíveis funções dessas enzimas, poderá se estabelecer uma relação com as vias metabólicas a que pertencem e qual seu papel na tolerância ao estresse causado pelo frio no estágio germinativo do arroz.

Um grande número de pesquisas relacionadas ao estresse causado sob baixas temperaturas tem sido realizadas buscando melhor compreender seus efeitos e mecanismos relacionados a sua tolerância. Porém, mesmo com o avanço nas técnicas de análise, as baixas temperaturas continuam sendo um problema no cultivo de diversas espécies.

Futuramente, as informações sobre as enzimas diferencialmente produzidas pelos genótipos sob este estudo também será armazenadas em bancos de dados, auxiliando pesquisas relacionadas à germinação sob baixas temperaturas, principalmente para espécies da família Poaceae. Estes dados também estarão disponíveis a programas de melhoramento genético do arroz, nos quais poderão ser utilizados para obtenção de genótipos mais tolerantes ao frio no estágio germinativo.

7 Conclusões

A técnica de cDNA/AFLP é eficiente para produzir e identificar fragmentos de genes diferencialmente expressos em genótipos de arroz com desempenho contrastante durante a germinação sob estresse de baixas temperaturas.

O mutante de arroz M3-202 expressa fragmentos contrastantes em relação ao genótipo BRS-7 Taim sob estresse do frio na germinação.;

O mutante de arroz M3-202 expressa fragmentos em comum com o genótipo tolerante ao frio BRS Firmeza sob estresse do frio na germinação;

A cultivar SCS BRS-113 Tio Taka expressa menor número de genes quando germinada a 13 °C.

REFERÊNCIAS

ANDAYA, V.C.; MACKILL, D.J. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.392, p.2579-2585, 2003.

APASSUL (Associação dos Produtores e Comerciantes de Sementes e Mudanças do Rio Grande do Sul). Disponível em: < www.apassul.com.br > Acesso em: ago 2008.

AOKI, A.; KANEGAMI, A.; MIHARA, M.; KOJIMA, T.; SHIRAIWA, M.; TAKAHARA, H. Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress **Gene**, v.356, n.15, p.135-145, 2005.

AZAMBUJA, I.H.V.; VERNETTI JR., F.J.; MAGALHÃES JR., A.M.: Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz. In: Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil (2005). Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/arroz/cap01.htm> > Acesso em: fev 2008.

BACHEM, C.W.B.; VAN DER HOEVEN, R.S.; BRUIJN, S.M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R.G.F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development **The Plant Journal**, v.9, n.5, p.745-753, 1996.

BACHEM, C.B.; OOMEN, R.J.F.J.; VISSER, R.G.F. Transcript Imaging with cDNA/AFLP: A Step-by-Step Protocol, **Plant Molecular Biology**, v.16, p.157-173, 1998.

BARBIERI, R.L. Evolução dos Organismos. In: **Genética e Evolução**. FREITAS, L.B.; BERED, F. (eds.) Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 277-290, 2003.

BARTELS, D.; NELSON, D. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics **Plant, Cell and Environment**, v.17, p.659-667,1994.

BLUM, A. Cold resistance. In: **Plant breeding for stress environments**. Boca Raton: CRC, 1988. p.99-132.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. **Melhoramento de Plantas**. 4 ed. Viçosa: UFV, 2005. 525p.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: **Marcadores Moleculares**, BORÉM, A. E CAIXETA, E.T. (Eds.) Viçosa, MG, 2006, p.09-78.

CAMARGO, C.E.O.; FERREIRA FILHO, A.W.P.; TULMANN NETO, A.; PETTINELLI JUNIOR, A.; CASTRO, J.L; FELICIO, J.C.; MISTRO, J.C.; SALOMON, M.V. Avaliação de linhagens de trigo originárias de hibridação com e sem irradiação gama **Bragantia**, v.64, n.1, p.61-74, 2005.

CARMONA, L.C.; BERLATO, M.A., BERGONCI, J.I. Relação entre elementos meteorológicos e rendimento do arroz irrigado no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 10, n. 2, p. 289-294, 2002.

CAVALLI, S.S. Polimorfismos Moleculares. In: . FREITAS, L.B.; BERED, F. (eds.) **Genética e Evolução Vegetal**, Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2003, p.311-332.

CHAVES, A.L.S. **Biologia Molecular para Iniciantes**. 2 ed. Pelotas: UFPel. Ed. Universitária, 2006. 160p.

CHEN, W.; TANG, Z.; SUO, F.; YONG, Y.; XUE, B. Expressional profiling of genes related to pollination and fertilization in rice **Comptes rendus de l'Académie des sciences, Sciences de la vie** v.324, p.1111-1117, 2001.

CHEN, G.P.; MAA, W.S.; HUANGA, Z.J.; XU, T.; XUEB, Y.B.; SHEN, Y.Z. Isolation and characterization of TaGSK1 involved in wheat salt tolerance. **Plant Science**, v.165, p.1369-1375, 2003.

COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; SILVA, J.A.G.; LORENCETTI, C. Comparação entre mutagênicos químico e físico em populações de aveia. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.46-55, 2005.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento): Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2007/08. Disponível em: <www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf> Acesso em: 9 set 2008.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Melhoramento Genético para Tolerância ao Frio em Arroz Irrigado. **Ciência Rural**, v.30, n.5, p.909-917, 2000.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C. Cold Tolerance At The Germination Stage Of Rice: Methods Of Evaluation And Characterization Of Genotypes. **Scientia Agricola**, v.61, n.1, p.1-8, 2004.

DE LOS REYS, B.; MORSY, M.; GIBBONS, J.; VARMA, T.; ANTOINE, W.; McGRANTH, J.; HALGREN, R.; REDUS, M. A snapshot of the low temperature stress transcriptome of developing rice seedlings (*Oryza sativa* L.) via EST's from subtracted cDNA library. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n.6, p.1071-1082, 2003.

DUNWELL, J.M.; MOYA-LEÓN, M.A.; HERRERA, R. Transcriptome analysis and crop improvement (A review). **Biology Research**, v.34, p.3-4, 2001.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária): Origem e História do Arroz. Disponível em: <www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm> Acesso em: 25 ago 2008.

FAGUNDES, P.R.; RABGEL, D.H.N.; MAGALHÃES JR., A.M. Melhoramento do Arroz Irrigado In: Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil (2005). Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/arroz/cap05.htm>> Acesso em: fev 2008.

FONSECA, F. S. **Seleção para constituições genéticas de interesse a fisiologia de sementes em uma população mutante de arroz**. 2007. 71p. Tese (Dourado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FAO (Food and Agriculture Organization): FAO Rice Conference, 2004 Disponível em: <www.fao.org/rice2004/en/pdf/hossain.pdf> Acesso em: ago 2008.

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

GILMOUR, S.J.I .; THOMASHOW, M.F. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana* **Plant Molecular Biology**, v.7, p.1233-1240, 1991.

GROVER, A. et al. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic estresse responses. **Current Science**, v.80, p.112-120, 2001.

GUY, C. Molecular Responses of Plants to Cold Shock and Cold Acclimation. **Journal Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.1, n.2, p.231-242, 1999.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) 2004. Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso em: ago 2008.

IRRI (International Rice Research Institute) Internacional Rice Genebank. Disponível em: <<http://mentewww.irri.org/GRC/irg/biodiv-genebank.htm>> Acesso em: 8 set 2008

IRRI (International Rice Research Institute) The International Rice Research Institute Library, 2005. Disponível em: <<http://www.riceib.irri.cgiar.org>> Acesso em: 8 set 2008.

ISHIY, T.; SCHIOCCHET, M.A.; BACHA, R.E.; MOREL, D.A.; ANDO, A.; TULMANN NETO, A.; KNOBLAUCH, R. Desenvolvimento da cultivar de arroz Ando San 114 por meio de mutação induzida. In: **IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**, 2005, Santa Maria. IV Congresso Brasileiro de arroz irrigado, Santa Maria, 2005,p.114-116.

KANEDA, C.; BEACHELL, H.M. Resistance of Japonica x Indica breeding lines to low temperatures. In: **Rice breeding**. Los Baños: International Rice Resarch Institute, 1972. p.541-545.

KLERING, E.V.; FONTANA, D.C.; BERLATO, M.A.; CARGNELUTTI FILHO, A. Modelagem agrometeorológica do rendimento de arroz irrigado no Rio Grande do Sul A. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.5, p.549-558, 2008.

LEE, H.; XIONG, L.; ISHITANI, M.; STEVENSON, B.; ZHU, J.K. Cold-regulated gene expression and freezinf tolerance in an *Arabidopsis thaliana* mutant. **The Plant Journal**, v.17, n.3, p.301-308, 1999.

LEE, S.C.; KIM, S.H.; CHOI, H.S.; LEE, M.Y.; KIM, J.Y.; JEON, S.H.; JEON, J.S. AN, G.; KIM, S.R. **Isolating and characterizing cold-responsive gene-trapped lines from rice**. *Advances in Rice Genetics*, 2004.

LEYMARIE, J.; BRUNEAUX, E.; GIBOT-LECLERC, S.; CORBINEAU, F. Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA/AFLP **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.3, p.425-437, 2007.

LI, S.C; ZENG, Y.W.; SHEN, S.Q.; PU, X.Y. Cold Tolerance of Core Collection at Booting Stage Associated with Eco-geographic Distribution in Yunnan Rice Landrace (*Oryza sativa*) **Rice Science**, v.11, p.261-268, 2004.

Li, T.G. Correlation of cold tolerance at different growth stages in rice. **Acta Botanica Sinica** 23, 203-207, 1981.

LIQIONG, G. JUNFANG, L. LIQING, Y. RUIRUI, L. Isolation of Cold Stress Genes through cDNA/AFLP from *Volvariella volvacea* **Acta Horticulturae Sinica**, v.32, p.54-59, 2005.

LODISH H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Biologia Molecular e Celular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 1083.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Cultivo do milho: Germinação e Emergência**. Comunicado Técnico. Embrapa Milho e Sorgo. 2002. 9p.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; MATTOS, L.A.T.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Assessment of the genetic variability among rice cultivars revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, n.1, p. 21-25, 2006

MALONE, G e ZIMMER P.D. Marcadores moleculares. In: ZIMMER, P.D, OLIVEIRA. A.C. e MALONE, G. **Ferramentas da biotecnologia** (org). Pelotas: Ed. Universitária, p.77- 114, 2005.

MALUSZYNSKI, M.; Crop germplasm enhancement through mutation techniques. In: **Proceedings of the international Symposium on Rice Germplasm Evaluation and Enhancement**. J.N. Rutger, J.F. Robinson and R.H. Dilday, editors. Arkansas, USA, 1998.

MAO, C.; YI, K.; YANG, L.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F.; 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**, v.55, n.394, p.137-143, 2004.

MARCOS FILHO, J. Germinação. In: MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes das plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. p.194-249.

MARIOT, C.H.P.; MENEZES, V.G. Época de semeadura: principal fator de produtividade de arroz irrigado no RS. **Lavoura arrozeira**, v.56, n.446, p.51-53, 2008.

MARTINS, A.F. **Caracterização Genética e Morfológica de Genótipos de Arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à tolerância ao frio** 2007. 84p. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitomelhoramento) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MARTINS, A.F.; VIEIRA, E.A.; KOPP, M.M.; LUZ, V.K.; CARVALHO, M.F.; BRANCO, J.S.C.; CRUZ, R.P.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Caracterização de famílias mutantes de arroz para tolerância ao frio nos períodos vegetativo e reprodutivo. **Bragantia**, v.66, n.2, p.227-233, 2007.

MERTZ, L. M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Estratégia de cDNA/AFLP para identificação de genes de interesse a fisiologia de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, 2008.

MURATA, N.; YAMAYA, J. temperature-dependent phase behaviour of phosphatidylglyccrols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. **Plant Physiology**, v.74, p.1016-1024, 1984.

NISHIYAMA, I. Effects of temperature on the vegetative growth of rice plants In: Climate and rice, 1976, **Anais do Symposium on Climate and Rice**, Los Baños: IRRI, 1976. p.159-186.

PANDINI, F.; CARVALHO, F.I.F.; BARBOSA NETO, J.F. Uso de mutações induzidas e cruzamentos recíprocos no incremento da variabilidade genética para o caráter ciclo vegetativo em triticales **Ciência Rural**, v.27, n.2, p.201-206, 1997.

PASSAGLIA, L.M.P.; ZAHA, A. Técnicas de Biologia Molecular. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P (eds.) **Biologia Molecular Básica**. 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003, p.379-413.

PASSAGLIA, L.M.P. Mutações e Mecanismos de Reparo de DNA. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P (eds.) **Biologia Molecular Básica**. 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003, p.149-158.

PEREIRA, J.A. **Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história.** Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2002, 226p.

PINHEIRO, B. da S. Características morfofisiológicas da planta relacionadas à produtividade. In: VIEIRA, N. R. de A.; SANTOS, A. B. dos; SANT'ANA, E. P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p. 116-147.

PORTILLO, M.; FENOLL, C.; ESCOBAR, C. Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: Combined effects of reagent type and homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. **Physiologia Plantarum**, v.128, n.1, p.1-7, 2006.

RABBANI, M.A.; RABBANI, S.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M.A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses **Plant Physiology**, v.133, p.1755-1767, 2003.

RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, C.; MORAIS, O.P.; SCHIOCCHET, M.A.; BORBA, T.C.O.; RANGEL, P.N.; BRONDANI, R.P.V.; YOKOYAMA, S.; BACHA, R.E.; ISHIY, T. Establishment of the irrigated rice cultivar SCSBRS Tio Taka by recurrent selection **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, p.103-110, 2007.

RANGEL, P.H.N.; GUIMARÃES, E.P.; NEVES, P.C.F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. V.31, n.5, p.349-357. 1996.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal.** 6 ed. Ed. Guanabara, 2001, 906p.

RODRIGUEZ, M.; CANALES, E.; BORROTO, C.J.; CARMONA, E.; LOPÉZ, J.; PUJOL, M.; BORRÁS-HIDALGO, O. Identification of genes induced upon water-deficit stress in a drought-tolerant rice cultivar. **Journal of Plant Physiology**, v.3, p.577-584, 2006.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SANTIS, A. de; LANGE, P.; GENCHI, G. Changes of Mitochondrial Properties in Maize Seedlings Associated with Selection for Germination at Low Temperature.

Fatty Acid Composition, Cytochrome c Oxidase, and Adenine Nucleotide Translocase Activities **Plant Physiology**, Rockville, v. 119. P 743-754, 1999.

SASAKI, Takuji; WU, Jianzhong; KANAMORI, Hiroyuki; et al. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 793-800, 2005.

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz Irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil / Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado; **V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**. 161p.– Pelotas: SOSBAI, 2007.

SOUZA, P.R. Alguns aspectos da influência do clima temperado sobre a cultura do arroz irrigado, no sul do Brasil. **Lavoura Arrozeira**, v.43, n.389, p.9-11, 1990.

SOUZA, V.Q.P.; PEREIRA, A.S.; KOPP, M.M.; COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; LUZ, V.K; OLIVEIRA, A.C. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, v.64, n.4, p.569-575, 2005.

STEINMETZ, S.; BRAGA, H.J; SILVA, S.C. Condições Climáticas para Cultivo do Arroz In: Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil (2005). Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/arroz/cap02.htm>> Acesso em: fev 2008.

SUPRUNOVA, T.; KRUGMAN, T.; DISTELFELD, A.; FAHIMA, T.; NEVO, E.; KOROL, A. Identification of a novel gene (Hsdr4) involved in water-stress tolerance in wild barley **Plant Molecular Biology** v. 64, p.17-34, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artemed, 2004. 719p.

TOKUHISA, J.G; FELDMANN, K. A; LABRIET, S.T; BROWSE, J. Mutational analysis of chilling tolerance in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p.1391-1400, 1997.

TORRES TORO, E. A. **Avaliação de linhagens de arroz (Oryza sativa) suscetíveis e tolerantes a baixas temperaturas em cruzamentos dialélicos parciais**. 2006. 143p. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

TULMANN NETO, A.; ALVES, M.C.; CAMARGO, C.E.O.; CASTRO, J.L.; FERREIRA FILHO, W.P. New wheat genotypes tolerant to aluminum toxicity obtained by mutation induction. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.1, p.61-70, 2001.

TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; SABINO, J.C. Indução de mutante para maior altura basal em feijoeiro através de raios gama. **Bragantia**, v.53, n.2, p.159-162, 1994.

VAUGHAN, D.A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza sativa* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.139-146, 2003.

VISWANATHAN, C.; ZHU, J.K. Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription C. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Serie B, Biological Sciences**, v.35, p.877-886, 2002.

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

YAMAGUCHI-SHINOZAKIAIB, K.; SHINOZAKI, K. A Nove1 cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene 1s Involved in Responsiveness to Drought, Lowqemperature, or High-Salt Stress **The Plant Cell**. v. 6, p.251-264,

YANG, L.; ZHENG, B.; MAO, C.; YI, K.; LIU, F.; WU, Y.; TAO, Q.; WU, P. cDNA/AFLP analysis of inducible gene expression in rice seminal root tips under a water deficit **Gene**, v.314, n.18, p. 141-148, 2003.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1981. cap.1, p.1-63.

ZAHA, A. H. Controle da Expressão Gênica em Eucariotos. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P (eds.) **Biologia Molecular Básica**. 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003, p.346-360.

ZIMMER, P. D.; MATTOS, L. A. T. de; OLIVEIRA, A. C. de; et al., Identification of Rice Mutants (*Oryza sativa* L.) for Agronomical and Root System Traits. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.195-199, 2003.