

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**SEMENTES**



Tese

**Relações bioquímicas e moleculares da germinação e emergência**  
**em arroz**

**GASPAR MALONE**

Pelotas, 2007

**GASPAR MALONE**

**Relações bioquímicas e moleculares da germinação e emergência em  
arroz**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Professor Silmar Teichert Peske (Ph.D), como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**Pelotas, 2007**

Dados de catalogação na fonte:  
( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

M257r Malone, Gaspar

Relações bioquímicas e moleculares da germinação e emergência em arroz / Gaspar Malone. - Pelotas, 2007.

72f. : il.

Tese ( Doutorado ) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2007, Silmar Teichert Peske, Orientador; co-orientador Paulo Dejalma Zimmer e Paulo Ricardo Rei Fagundes

1. Oryza sativa L. 2. Populações segregantes 3. Marcadores moleculares 4. Emergência I Peske, Silmar Teichert (orientador) II .Título.

CDD 633.18

### **Comitê de Orientação**

Orientador: Prof. Ph.D. Silmar Teichert Peske, DFt/FAEM/UFPeI

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer, DFt/FAEM/UFPeI

Co-orientador: Dr. Paulo Ricardo Rei Fagundes, Embrapa – CPACT

### **Banca Examinadora**

Prof. Silmar Teichert Peske, PhD. (Presidente)

Prof. Paulo Dejalma Zimmer, Dr.

Prof. Valmor Bianchi, Dr.

Pesq. Elbio Treicha Cardoso, Dr.

Prof. Francisco Amaral Villela, Dr.

Prof. Luis Osmar Braga Schuch, Dr.

## DEDICATÓRIA

Nada nessa vida conseguimos fazer sozinhos, sempre ficaremos devendo grande parte de nossos êxitos a pessoas que, incansavelmente nos deram forças para ir a cada dia um pouco mais para a frente. É por isso, que atingir este degrau na minha carreira profissional é puro mérito de grandes pessoas que fizeram pequenas coisas, porém, bem feitas e na hora certa. Quero dedicar especialmente aos meus pais *Stella e Carlos*, simplesmente por nunca terem truncado minhas idéias e princípios, e por ser o pilar onde se assenta toda minha vida, aos meus irmãos, *Emilia e Manuel*, pelo apoio, incessante companhia e compreensão e a minha esposa *Paula*, por ter me permitido conhecer o amor, a compreensão, o carinho e por sempre estar do meu lado em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria também de agradecer a todas aquelas pessoas que de alguma ou outra forma contribuíram para que eu chegue até aqui.

Agradeço, em especial, o Professor Silmar Teichert Peske, pela excelente orientação, convicção de empurrar sempre para frente e pelas conversas cheias de otimismo e ensinamentos. Sem dúvida, uma pessoa para a qual ficarei devendo grande parte de meu sucesso profissional.

Agradeço ao Professor Paulo Dejalma Zimmer, por ter sido, além de um excepcional co-orientador, um grande amigo, companheiro e profissional. A ele devo a outra metade do meu sucesso profissional.

Agradeço aos Pesquisadores Dr. “Paulinho” Rei Fagundes e Dr. Ariano Magalhães do CPACT - Embrapa, por terem participado incessantemente, na minha formação, facilitando de grande forma a execução das tarefas relacionadas ao trabalho.

Agradeço a toda a equipe de professores do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Prof. Francisco Amaral Vilela, Prof. Leopoldo Mario Baudet, Prof. Orlando Lucca Filho, Prof. Antonio Carlos Souza Albuquerque Barros, Prof<sup>a</sup>. Maria Ângela Tillmann, Prof. Luis Osmar Braga Schuch, pelo contínuo apoio durante a minha estada no PPGC&TS.

Aos Professores Antonio Costa de Oliveira e Fernando Irajá Felix de Carvalho e toda sua equipe do Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento pelas parcerias estabelecidas e intercambio de conhecimentos, equipamentos, entre outros.

Aos funcionários do PPGC&TS, Bandeira, Silvio, Alice e Ireni, pela amizade e colaboração.

Aos Pesquisadores do CNPAF – Embrapa, Dr. Cláudio Brondani e sua esposa Dra. Rosana Vianello Brondani, o Dr. Péricles de Castro Neves e todos os funcionários,

estudantes e estagiários do Laboratório de Biotecnologia do CNPAF, agradeço pela convivência e por ter me possibilitado a execução de uma importante etapa do meu trabalho.

Agradeço também todos os colegas do Laboratório de Biosementes, Geri, Carol, Fernandão, Lili, Helen, Patrícia, Guilherme, Fernandinha, Fernanda, Cibele... e toda e essa turma, que certamente agora estou me esquecendo de alguém, por esses maravilhosos anos de convivência e troca de experiências.

A FAPERGS, CAPES, CNPq, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>SUMMARY</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. CAPITULO I - Caracterização bioquímica e molecular de ecótipos de arroz vermelho coletados no estado de rio grande do sul</b> .....	5
2.1. Resumo .....	6
2.2. Abstract.....	7
2.3. Introdução .....	8
2.4. Material e métodos .....	11
2.5. Resultados e discussão.....	14
2.6. Conclusões.....	22
<b>3. CAPITULO II - Identificação de polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) no gene <math>\alpha</math>-amilase amy1 de arroz vermelho: efeito no fenótipo do vigor de plântula</b> .....	23
3.1. Resumo .....	24
3.2. Abstract.....	25
3.3. Introdução .....	26
3.4. Material e métodos .....	28
3.5. Resultados e discussão.....	31
3.6. Conclusão .....	37
<b>4. CAPITULO III - Regiões genômicas associadas à germinação/emergência em arroz identificadas mediante estudos de associação de marcadores moleculares do tipo microssatélite</b> .....	38

	vii
4.1. Resumo .....	39
4.2. Abstract.....	40
4.3. Introdução .....	41
4.4. Material e métodos .....	45
4.5. Resultados e discussão.....	49
4.6. Conclusões .....	61
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>62</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 2.1</b> - Seqüência de anelamento e localização cromossômica dos 19 <i>Primers</i> microssatélite utilizados. UFPel/Pelotas, 2006.....	12
<b>TABELA 2.2</b> - Frequência e valores de PIC ( <i>Polymorphism Information Content</i> ) para cada um dos 55 alelos microssatélite analisados. UFPel/Pelotas, 2006.....	15
<b>TABELA 2.3</b> - Frequência e valores de PIC ( <i>Polymorphism Information Content</i> ) para cada um dos 23 alelos isoenzimáticos analisados. UFPel/Pelotas, 2006.....	18
<b>TABELA 3.1</b> - Alterações de nucleotídeos e substituição de aminoácidos no gene $\alpha$ -amylase AMY1 em oito ecótipos de arroz vermelho. UFPel/Pelotas, 2006.....	34
<b>TABELA 4.1</b> - Número de plantas emergidas e percentagem de germinação das 32 famílias F <sub>3</sub> que apresentaram germinação/emergência em 15 cm de profundidade, UFPel, Pelotas, 2006.....	50
<b>TABELA 4.2</b> - Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador RM206. UFPel/Pelotas, 2006.....	53
<b>TABELA 4.3</b> - Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador RM208. UFPel/Pelotas, 2006.....	54
<b>TABELA 4.4</b> - Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador RM243.	

	UFPel/Pelotas, 2006.....	ix
	UFPel/Pelotas, 2006.....	55
<b>TABELA 4.5 -</b>	Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador OG79.	
	UFPel/Pelotas, 2006.....	56
<b>TABELA 4.6 -</b>	Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador OG110.	
	UFPel/Pelotas, 2006.....	57

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1** - Dendrograma obtido com base na similaridade genético-molecular utilizando 55 marcadores microssatélite. O agrupamento foi obtido utilizando o método ligação completa..... 17
- FIGURA 2.2** - Dendrograma obtido com base na similaridade genético-molecular utilizando 23 marcadores isoenzimáticos. O agrupamento foi obtido utilizando o método ligação completa..... 19
- FIGURA 3.1** - Alinhamento parcial das seqüências do gene AMY1 em oito ecótipos de arroz vermelho e da cultivar Nipponbare. As caixas indicam as seis regiões codificadoras com polimorfismos nucleotídicos simples (cSNP) ..... 32
- FIGURA 3.2** - Alinhamento parcial entre a seqüência conhecida da proteína  $\alpha$ -amilase AMY1 da cultivar de arroz Nipponbare e a proteína  $\alpha$ -amilase 1AMY da cevada. Os polimorfismos de aminoácidos (caixas) entre AMY1 e 1AMY foram desconsiderados na análise de ecótipos de arroz vermelho..... 32
- FIGURA 3.3** - O programa de visualização gráfica SWISS-PDB foi utilizado para simular o efeito da substituição de aminoácidos no gene  $\alpha$ -amilase AMY1 do arroz vermelho. A porção do exon 2 analisada nesse estudo aparece em destaque..... 33
- FIGURA 3.4** - Alinhamento parcial das seqüências do exon 2 da proteína  $\alpha$ -amilase Amy1 em oito ecótipos de arroz vermelho e a cultivar de arroz Nipponbare. As caixas referem aos cinco pontos de substituição de aminoácidos..... 35

<b>FIGURA 4.1</b> - Detalhes da montagem do teste fisiológico de germinação em grandes profundidades.....	46
<b>FIGURA 4.2</b> - Diagrama ilustrativo dos passos envolvidos na identificação de marcadores moleculares associados com características de interesse mediante a metodologia DNA Pooling.....	48
<b>FIGURA 4.3</b> - Detalhe das sementes F <sub>1</sub> na panícula (A) e colhidas (B).....	49
<b>FIGURA 4.4</b> - Perfil molecular dos 5 marcadores moleculares associados à germinação/emergência de sementes em arroz. (A) Pool positivo (com o caráter); (B) Parental BRS 7 "Taim" (sem o caráter).....	51
<b>FIGURA 4.5</b> - Localização cromossômica no mapa genético dos marcadores RM243, OG79, RM208, OG110 e RM206, associados ao vigor de sementes em arroz. Baseado nos mapas genéticos de Chen <i>et al.</i> , (1997) e Brondani <i>et al.</i> , (2001).....	51
<b>FIGURA 4.6</b> - Imagem parcial do banco de dados GRAMENE, onde pode ser observada a localização cromossômica do marcador RM206 (A) e ampliação da região genômica ilustrando os <i>contigs</i> e a localização específica do marcador RM206 (B).....	58

**RESUMO****RELAÇÕES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DA GERMINAÇÃO E EMERGÊNCIA EM ARROZ**

**Autor:** Malone, Gaspar.

**Orientador:** Prof. Ph.D: Silmar Teichert Peske

RESUMO - No presente trabalho, uma coleção de ecótipos de arroz vermelho, com promissoras características fisiológicas associadas aos componentes de vigor de sementes, foi utilizada como fonte de trabalho para a execução de três trabalhos de pesquisa que visam melhor entender o processo de germinação/emergência em arroz. Num primeiro trabalho, foi realizada uma caracterização bioquímica e molecular desta coleção com o objetivo de identificar aqueles que apresentaram melhor potencial de hibridização para a obtenção de populações segregantes de mapeamento genético. Num segundo trabalho de pesquisa, um dos genes da  $\alpha$ -amilase do arroz, fortemente ligado ao processo de degradação das reservas do endosperma durante o processo de germinação, foi analisado através de estudos de Seqüenciamento de DNA, para a identificação de mutantes para este gene entre os membros da coleção de ecótipos de arroz vermelho. Os efeitos das mutações foram assim, analisados em relação ao desempenho fisiológico dos ecótipos. No terceiro trabalho, uma população segregante proveniente do cruzamento entre o ecótipo de arroz vermelho FFS-45 (com o caráter germinação/emergência em grandes profundidades do solo) e a cultivar BRS 7 “taim” (sem o caráter), foi utilizada para a realização de estudos de associação de marcadores moleculares ligados ao caráter, utilizando a técnica de análise de DNA em bulk. Ao todo, cinco marcadores foram identificados como associados ao caráter germinação/emergência. Os resultados geraram informações que contribuíram para o entendimento do processo fisiológico/molecular de germinação/emergência em sementes de arroz.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., Populações segregantes, Marcadores moleculares, Emergência.

## SUMMARY

### BIOCHEMICAL AND MOLECULAR RELATIONS OF GERMINATION AND EMERGENCE IN RICE

**Student:** Malone, Gaspar.

**Adviser:** Prof. Ph.D. Silmar Teichert Peske.

SUMMARY - In this work, a collection of red rice ecotypes, with promising physiological characteristics associated to seed vigor, was used to conduct three studies to understand the germination/emergence process in rice. In the first study, a biochemical and molecular characterization of the collection was performed to identify the parent's with the best hybrid potential to obtain segregant mapping populations. In the second study, the AMY1  $\alpha$ -amylase gene of rice, involved in the breakdown of endosperm starch during germination, was analyzed by DNA sequencing, to identify mutants to this gene from red rice ecotypes. The mutation effects were analyzed through physiological performance of ecotypes. In the last study, an segregant population from FFS-45 red rice ecotype (with germination/emergence character) and BRS 7 "taim" cultivar (without the character), was used to identify molecular markers linked to the trait by DNA Pooling methodology. The molecular markers identified were used to gene prospecting in the respective genomics regions. Five SSR markers were identified linked to germination/emergence process. Results of these researches generated a great amount of data that can be contribute to understand the physiological/molecular process involved in rice seed germination/emergence process.

Key-words: *Oryza sativa* L., segregant populations, Molecular markers, Emergence.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Pode-se começar o seguinte parágrafo formulando algumas perguntas, tais como: Germinação e emergência são a mesma coisa? O que é o vigor de sementes? Tem sido bastante difícil formar uma definição para cada um destes conceitos, pois, embora a germinação acabe com a emissão da radícula, o desenvolvimento da plântula até que ela atinge a superfície do solo também fazem parte do processo germinativo. Uma plântula em crescimento, germinou de uma semente que estava no solo, a alguns centímetros da superfície e, portanto, a plântula teve que percorrer certa distância entre a semente e a superfície para se converter em um organismo fotossintetizante e autotrófico. A partir deste ponto pode se dizer que a plântula emergiu. Entretanto, até este momento, a mesma era totalmente mantida pelas reservas contidas nas sementes. Deste modo pode se afirmar que a germinação é uma combinação de fatores que se reflete sobre o potencial da semente para estabelecer uma plântula normal, conhecido comumente como “vigor da semente”.

É importante destacar as variações do conceito de germinação sob os diferentes pontos de vista. Para o fisiologista de sementes, por exemplo, a germinação acontece com a emissão da radícula, portanto, muito antes dela emergir do solo. O analista de sementes considera germinada a semente que consegue produzir uma plântula normal e sadia sob condições adequadas de ambiente. E para os agricultores, o mais interessante é o número de plantas por área, portanto, para eles, germinação é sinônimo de “emergência” de plântulas no campo. Embora haja discrepâncias de conceitos, na prática todos eles devem ser considerados.

O vigor de sementes é, sem dúvidas, um dos mais importantes atributos agronômicos que garantem um adequado estande de plantas no campo, especialmente em cereais de climas temperados, onde fatores tais como: práticas de manejo

ineficientes, ou temperaturas do solo inadequadas, impõem as sementes um estresse que influencia diretamente no crescimento e desenvolvimento das plântulas (Redoña & Mackill, 1996; Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). O melhoramento de caracteres associados à qualidade fisiológica das sementes se constitui atualmente num dos maiores desafios dos programas de melhoramento. O problema é que, na maioria dos casos, o melhorista, simplesmente, tem pouca compreensão do que a qualidade fisiológica da semente representa e qual a sua importância na produção da lavoura. Ganhar a atenção dos melhoristas e/ou geneticistas tem sido a principal dificuldade (Delouche, 2006).

O vigor de sementes não somente incrementa a percentagem de plantas emergidas como também, confere habilidade para competir com espécies daninhas no campo. Em arroz, o percentual de germinação e a rápida emergência das plântulas no campo constituem-se nos dois atributos principais que caracterizam o vigor de sementes, sendo particularmente importante durante as fases iniciais de desenvolvimento, onde a competição com plantas daninhas é muito severa durante o estabelecimento da cultura. O período de emergência e o estágio de plântula representam um período particularmente sensível, sendo uma fase decisiva para a sobrevivência da planta e para a distribuição espacial de uma população. Entre as características desejadas de cultivares de arroz irrigado, citam-se plantas com elevado vigor vegetativo inicial, procurando-se plantas mais vigorosas na germinação.

A importância do vigor de sementes para a agricultura é considerada por Kryzanowsky & França - Neto (1999), no rápido e uniforme estabelecimento da população adequada de plântulas no campo, pois, a qualidade dessas plântulas irá refletir nos resultados da produção. Conseqüentemente, o vigor é o atributo de qualidade que melhor expressa o desempenho da semente, no que concerne ao seu ciclo vital de reprodução e propagação da espécie. Trabalhando com desuniformidade na profundidade de semeadura de sementes de aveia Almeida & Mundstock (2001) concluíram que, a competição intra-específica resultante da desuniformidade na emergência afetou a alocação de massa seca nas plantas, determinando menor emissão de afilhos e menor alocação de matéria seca no colmo principal e afilhos. Isto, possivelmente associado a diferenças no metabolismo das reservas.

A grande maioria das espécies cultivadas possui limitada variabilidade genética, decorrente principalmente da utilização de germoplasma muito aparentado como genitores nos programas de melhoramento, resultando no estreitamento da base genética

das populações para a obtenção de novas cultivares e, conseqüentemente, diminuindo os ganhos genéticos com a seleção (Cooper *et al.*, 2001). O nível de diversidade genética varia muito de espécie para espécie, desde a alta homogeneidade das linhas puras de espécies autógamas, como arroz, trigo, tomateiro e soja, até a alta variabilidade em espécies alógamas florestais, como o eucalipto. Em teoria, quanto menor a variabilidade genética, menores as chances de se obter resultados satisfatórios em longo prazo (Falconer, 1987). A perda de diversidade genética faz parte da história evolutiva durante a domesticação de grande parte das espécies vegetais cultivadas, seja por interferência do homem ou por seleção natural.

Para vários cultivos, os melhoristas têm utilizado somente uma fração dos recursos genéticos de plantas que estão disponíveis, e os ganhos obtidos até hoje são devidos justamente à exploração desta variabilidade genética limitada. A ampliação da base genética do arroz, através da incorporação de genótipos com grande variabilidade genética como novos genitores nos programas de melhoramento, permite que novas combinações alélicas possam ser obtidas e selecionadas, resultando em cultivares comerciais que atendam as demandas da cultura.

Entre os métodos mais utilizados para ampliação da base genética, a obtenção de grandes populações segregantes provenientes de cruzamentos amplos, envolvendo normalmente um genótipo elite e um genótipo exótico (variedades antigas e espécies silvestres, parentes de espécies cultivadas) tem sido a opção mais utilizada para a incorporação e disponibilização de novos genes aos programas de melhoramento (Dekkers & Hospital, 2002).

O desenvolvimento de marcadores moleculares abre a possibilidade de obtenção de estimativas da diversidade genética de acessos armazenados em bancos de germoplasma com muito maior precisão do que as baseadas unicamente na análise morfológica. Acessos com perfis de DNA mais distintos em relação às linhagens e cultivares comerciais provavelmente contêm um número maior de novos alelos de genes relacionados a características de interesse (Tanksley & McCouch, 1997).

Com a obtenção de populações segregantes e a utilização de avançadas técnicas de biotecnologia e marcadores moleculares torna-se possível à localização e clonagem dos genes relacionados com características de interesse à fisiologia de sementes.

Presume-se que um grande número de genes esteja envolvido na expressão do vigor de sementes, o que o constitui numa característica quantitativa, ou QTL

(*Quantitative Trait Loci*), com vários genes envolvidos na expressão fenotípica do caráter.

Para o estudo de QTLs, são desenvolvidas grandes populações segregantes as quais são analisadas utilizando técnicas de marcadores moleculares, e através de uma caracterização fenotípica da expressão do QTL em cada um dos indivíduos da população.

Caso um determinado marcador se correlacionar favoravelmente a uma determinada característica, provavelmente este marcador estará muito próximo ao gene responsável pela expressão desta característica. Os marcadores identificados podem ou não corresponder a genes de fato, podendo ser compostos por parte do gene ou, inclusive, por uma região adjacente ao gene de interesse. Neste caso, quanto mais afastado estiverem estes marcadores dos genes responsáveis pela expressão da característica, maior a chance de que, em uma meiose, estes marcadores segreguem independentemente do gene, perdendo-se a relação entre a presença do marcador e o alelo favorável.

Após a identificação de marcadores relacionados a características de interesse através da análise de QTLs, podem-se conduzir testes de DNA nas linhagens derivadas do cruzamento inicial, para descobrir e selecionar as plantas que possuam os alelos favoráveis em homozigose para os QTLs identificados. A este procedimento convencionou-se chamar de Seleção Assistida por Marcadores (SAM). Vários autores têm identificado e mapeado genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associados com vigor de sementes utilizando grandes populações segregantes e Linhas Endogâmicas Recombinantes (LERs) em arroz (Redoña and Mackill, 1996; Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.* 2005).

Os objetivos deste trabalho são:

- Analisar a variabilidade genética em uma coleção de ecótipos de arroz vermelho, através da utilização de marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas e marcadores moleculares do tipo microssatélite.

- Revelar variações nucleotídicas simples em três regiões internas do gene  $\alpha$ -amylase AMY1. Numa coleção de arroz vermelho e estudar o efeito destas variações na expressão fenotípica da germinação/emergência em arroz.

- Prospectar e caracterizar genes associados á germinação/emergência em grandes profundidades do solo em arroz, mediante a identificação de marcadores moleculares do tipo microssatélite.

## **2. CAPÍTULO I**

### **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ECÓTIPOS DE ARROZ VERMELHO COLETADOS NO ESTADO DE RIO GRANDE DO SUL**

## 2.1. RESUMO

O arroz vermelho constitui-se no competidor de maior influência no cultivo de arroz no Brasil, podendo alcançar 80-90% de infestação quando as práticas culturais não são devidamente aplicadas. O prejuízo anual supera 250 milhões de reais, considerando-se as perdas em toda a cadeia produtiva do arroz. Por outro lado, o arroz vermelho constitui-se num acervo de genes perdidos durante a domesticação do arroz cultivado e poderá ser de fundamental importância para a recuperação de constituições gênicas promissoras. Porque compartilha características morfológicas e eventos fisiológicos importantes com o arroz cultivado. As iniciativas de mapeamento gênico, projetos genomas e de prospecção de genes estão contribuindo para isso. O propósito deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de uma coleção de ecótipos de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) coletados no Estado de Rio Grande do Sul (Brasil), através de marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas e moleculares do tipo microssatélites. Trinta e quatro ecótipos, pertencentes ao banco de germoplasma do Laboratório de Sementes e Biotecnologia (FAEM/UFPel), foram analisados utilizando seis sistemas isoenzimáticos e 19 marcadores microssatélites. Vinte e três alelos bioquímicos e 55 moleculares foram identificados e utilizados para estimar os índices de polimorfismo (PIC) e similaridade genética. Ambos os sistemas de detecção de polimorfismo revelaram elevado grau de polimorfismo na população de arroz vermelho analisada, evidenciando sua potencialidade para o mapeamento de características de interesse à fisiologia de sementes.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., marcadores bioquímicos, marcadores microssatélites, variabilidade genética.

## 2.2. ABSTRACT

Red rice is a major competitor of cultivate rice in Brazil, could reach 80-90% of infestation when cultural practices are not properly applied. The annual damage overcomes US\$ 100 million, considering the losses in the rice productive chain. On the other hand, the red rice constitutes in a collection of lost genes during breeding of the cultivated rice and has a fundamental importance for recovering promising genetics constitutions. I shares important morphologic and physiologic characteristics with the cultivated rice. Gene mapping, genome sequencing and gene prospection projects are contributing to that. This work has the objective to analyze the genetic variability of an red rice ecotypes collection (*Oryza sativa* L.) from Rio Grande do Sul state (Brazil), through isoezimatics and microsatelites markers. Thirty four ecotypes, from the germplasm bank of Laboratorio de Sementes e Biotecnología (FAEM/UFPeI), were analyzed using 6 isoenzimatics systems and 19 microsatelites markers. Twenty three biochemical and 55 moleculars alleles were identified and used to estimate the polymorphism (PIC) and genetic similarity indexes. Both polymorphism system detection showed a wide polymorphism index thought red rice population, promising a great potential to genetic mapping of physiological seed traits.

Key-words: *Oryza sativa* L., biochemical markers, microsatélites markers, genetic variability.

### 2.3. INTRODUÇÃO

O arroz é uma das espécies que mantém maior número de coleções de germoplasma ex-situ no mundo (Jackson & Juggan 1993). O acesso a essa coleção de cultivares, ecótipos selvagens e seus parentes daninhos, é que o converte num alvo de interesse para programas de melhoramento e de produção de sementes. O surgimento das tecnologias de marcadores bioquímicos na década de 60, e de DNA na década de 80, auxiliou decisivamente na caracterização e manutenção destes recursos genéticos de tão elevado valor à pesquisa e ao desenvolvimento (Olufowote *et al.*, 1997; Virk *et al.*, 1995) e na determinação da estrutura genética e padrões de variabilidade entre as cultivares (Akagi *et al.*, 1997; Mackill, 1995; Yang *et al.*, 1994).

Desta maneira, os marcadores bioquímicos, do tipo isoenzimas, apresentam algumas desvantagens em relação às demais técnicas de caracterização molecular utilizadas atualmente. As isoenzimas são produtos da expressão gênica e conseqüentemente, altamente influenciadas pelo ambiente. Isto, sem dúvida, constitui-se numa grande desvantagem em relação às demais técnicas de marcadores moleculares. Portanto, técnicas isoenzimáticas são altamente influenciadas pelo estágio de desenvolvimento, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinados estádios do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos (Ramírez *et al.*, 1991).

Diferentemente dos descritores morfológicos e bioquímicos, os marcadores moleculares podem revelar diferenças entre os genótipos de forma mais eficiente e o que é mais importante, por atuarem diretamente sobre o genoma do organismo, são mais estáveis, não são influenciados pelo ambiente (Malone & Zimmer, 2005). Entre os

vários tipos de marcadores moleculares que estão disponíveis atualmente, merecem destaque *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Willwams *et al.*, 1990), *Amplified Fragments Length Polymorphism* (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) e Microsatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) (Tautz, 1989).

Os microssatélites são marcadores baseados na amplificação de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR – Polimerase Chain Reaction*) e têm sido muito utilizados pelos geneticistas de plantas, especialmente por apresentar uma relação custo/benefício elevada e, dependendo da espécie, um grande número de microssatélites pode ser obtido. No arroz, centenas de loci SSR têm sido seqüenciados e disponibilizados publicamente (Panaud *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Temnykh *et al.*, 2000). Comparado com as demais técnicas, os marcadores moleculares do tipo microssatélites são altamente polimórficos e apresentam elevada capacidade para detectar polimorfismos entre os diferentes acessos, espécies ou indivíduos de uma mesma população. Vários trabalhos manifestam a sua utilidade e aplicabilidade em arroz (Wu & Tanksley, 1993; Yang *et al.*, 1994, Akagi *et al.*, 1997).

Os marcadores do tipo microssatélites, assim como os marcadores do tipo isoenzimático apresentam uma vantagem em comum. Ambos são marcadores de tipo co-dominante, o que possibilita a identificação de todos os alelos (variantes) para um mesmo gene/locus. Isso é de fundamental importância em estudos de estruturação genética de populações, análises de paternidade e contaminações genéticas, por exemplo.

Vários estudos sobre diversidade genética em arroz vermelho têm sido reportados. Como exemplo, coleções de arroz vermelho têm sido classificadas nas subespécies Indica e Japônica com base em características morfológicas e fisiológicas, isoenzimas e marcadores moleculares do tipo RFLP e RAPD (Cho, *et al.*, 1995; Suh *et al.*, 1997). Langevin *et al.* (1990), analisaram a similaridade genética entre o arroz vermelho e as variedades comerciais utilizando os sistemas isoenzimáticos Catalase (CAT), Isocitrato Deshidrogenase (IDH) e Fosfoglucoisomerase (PGI). Trabalhos semelhantes desenvolvidos por Augustin *et al.* (1997), diferenciaram o arroz vermelho das variedades de arroz comerciais utilizando as enzimas Fosfoglucoisomerase (PGI) e Esterase (EST).

Marcadores do tipo microssatélite também têm sido utilizados na caracterização de populações de arroz daninho e na identificação de hibridizações entre as cultivares convencionais e os diferentes tipos de arroz infestante (Gealy *et al.*, 2002).

O conhecimento da relação genética poderá ser considerado para a escolha de genitores em estudos de hibridizações com variedades de arroz cultivado na geração de populações de mapeamento, visando o desenvolvimento de marcadores ou a clonagem de genes relacionados a caracteres de interesse á fisiologia de sementes, tais como germinação a grandes profundidades, vigor, tolerância ao frio e ciclo.

O presente trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade genética em uma coleção de ecótipos de arroz vermelho, através da utilização de marcadores bioquímicos e marcadores moleculares, para auxiliar na escolha de genitores de uma população de mapeamento para o caráter germinação/emergência em arroz.

## 2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e quatro ecótipos de arroz vermelho, coletados nas regiões produtoras de arroz, no Estado do Rio Grande do Sul. Sementes de cada um desses ecótipos foram colocadas para germinar, acondicionadas em rolo de papel, a 25°C de temperatura, segundo indicação das Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 1992). Após 15 dias, material foliar proveniente de um bulk de 10 plântulas para cada ecótipo foi coletado e imediatamente congelado a -20°C até o momento da extração de DNA, conforme protocolo CTAB 2% (Saghai Maroof *et al.*, 1994). Para extração de isoenzimas, foram utilizadas 10 sementes secas de cada ecótipo.

Para a análise molecular utilizando marcadores moleculares microsatélite foram utilizados 19 pares de primers microsatélites (Tabela 2.1) escolhidos segundo Panaud *et al.* (1995).

As reações de amplificação (PCR) foram realizadas em termociclador MJ research modelo PTC-100. Cinquenta ng de DNA genômico total foram combinados com 330 nM de cada *primer* microsatélite, 250 µM de cada dNTP e 0,6U de Taq DNA polimerase em volume final da reação de 15 µL. O seguinte programa de amplificação foi utilizado: (i) desnaturação inicial de 3 min a 94°C, (ii) 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 2 min, 72°C por 1,5 min, e (iii) extensão final a 72°C por 5 min. O produto da amplificação foi visualizado em géis de agarose 3% corados com brometo de etídeo.

Para a análise bioquímica utilizando marcadores do tipo isoenzimas, o *bulk* de 10 sementes para cada um dos 34 ecótipos, foi macerado no tampão de extração, em gral de porcelana sobre cubos de gelo. De cada uma das amostras, 200 mg do extrato vegetal foram colocados em tubo eppendorf acrescidos de solução extratora (tampão do gel +

0,15% de 2-mercaptoetanol) na proporção 1:3 (p/v). Foram utilizados os sistemas isoenzimáticos Esterase (EST), Fosfatase Ácida (ACP), Glutamato Deshidrogenase (GDH), Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT), Malato Deshidrogenase (MDH) e Álcool Deshidrogenase (ADH).

**TABELA 2.1** - Seqüência de anelamento e localização cromossômica dos 19 *Primers* microssatélite utilizados. UFPel/Pelotas, 2006.

Primer	Cromossomo	Seqüência de anelamento (5'-3')	
		Sense (sentido 3'-5')	Antisense (sentido 5'-3')
RM55	3	CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG	TCCCGGTTATTTAAGGCG
RM81	1	GAGTGCTTGTGCAAGATCCA	CTTCTTCACTCATGCAGTTC
RM202	11	CAGATTGGAGATGAAGTCCTCC	CCAGCAAGCATGTCAATGTA
RM205	9	CTGGTCTGTATGGGAGCAG	CTGGCCCTTACGTTTCAGTG
RM207	2	CCATTCGTGAGAAGATCTGA	CACCTCATCCTCGTAACGCC
RM210	8	TCACATTCCGGTGGCATTG	CGAGGATGGTTGTTCACTTG
RM212	1	CCACTTTCAGTACTACCAG	CACCCATTTGTCTCTCATTATG
RM219	9	CGTCGGATGATGTAAAGCCT	CATATCGGCATTCGCCTG
RM220	1	GGAAGGTAAGTGTTCACAC	GAAATGCTTCCCACATGTCT
RM222	10	CTTAAATGGGCCACATGCG	CAAAGCTTCCGGCCAAAAG
RM223	8	GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC	GAGGCAAGTCTTGGCACTG
RM232	3	CCGGTATCCTTCGATATTGC	CCGACTTTTCTCCTGACG
RM233	2	CCAAATGAACCTACATGTTG	GCATTGCAGACAGCTATTGA
RM234	7	ACAGTATCCAAGGCCCTGG	CACGTGAGACAAAGACGGAG
RM239	10	TACAAAATGCTGGGTACCCC	ACATATGGGACCCACCTGTC
RM241	4	GAGCCAAATAAGATCGCTGA	TGCAAGCAGCAGATTTAGTG
RM247	12	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTTGACAAAGCG
RM249	5	GGCGTAAAGTTTTGCATGT	ATGATGCCATGAAGGTCAGC
RM261	4	CTACTTCTCCCCTTGTGTGC	TGTACCATCGCCAAATCTCC

RM – Rice Microsatellite

A eletroforese das isoenzimas foi realizada em géis de poliacrilamida 7%, colocando 20  $\mu$ L de cada amostra, em orifícios feitos com o auxílio de um pente de acrílico. Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas mantidas em câmara fria com temperatura entre 4 e 6°C. As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de 10 V  $\text{cm}^{-1}$ , até que a frente de corrida, formada pelo azul de bromofenol, atingisse 9 cm do ponto de aplicação. Foram utilizados os sistemas de coloração descritos por Scandalios (1969) e Alfenas (1998).

O Conteúdo de Informação Polimórfica (*PIC – Polymorphism Information Content*), proposto por Anderson *et al.* (1993), foi calculado em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência, para determinar os valores de cada marcador, molecular e isoenzimático, na detecção de polimorfismo entre os 34 ecótipos de arroz vermelho analisados. Os valores de PIC para cada marcador foram determinados conforme a seguinte fórmula:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Onde  $P_{ij}$  é a frequência de cada padrão para o marcador  $i$ , a soma se estende por todos os padrões. O cálculo foi baseado no número de alelos detectados por um marcador para um determinado loci e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos 34 ecótipos analisados. O valor do PIC varia de 0 para perfis monomórficos, até 1 para perfis altamente polimórficos. Esse valor está relacionado com o número de alelos, que por sua vez está diretamente relacionado com a divergência e com o número de genótipos em estudo.

A presença (1) ou ausência (0) de cada alelo microssatélite e isoenzimático foi determinada e utilizada para a construção de uma matriz binária para análise. As análises de similaridade genética, cofenética e de agrupamento foram realizadas utilizando o programa computacional NTSyS pc 2.1 (Rohlf, 2000). A similaridade genética foi estimada usando o coeficiente de NEI & LI (Nei & Li, 1979). A similaridade genética média e análise de bootstrapping com 1000 amostragens foram utilizadas como parâmetros para a formação dos grupos. Os 34 ecótipos foram agrupados com base na matriz de similaridade genética utilizando o método de ligação completa.

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Análise de microssatélite*

Os 19 primers microssatélite utilizados detectaram 54 alelos nos 34 ecótipos de arroz vermelho, dos quais 52 (96,29%) foram polimórficos. O número de alelos por loco variou de 1 até 4, com uma média de 2,89 alelos por loco. Embora fosse esperada alta variabilidade genética em função de serem ecótipos selvagens, esse valor é considerado elevado para uma espécie diplóide. Analisando uma coleção de 56 variedades comerciais com 249 marcadores AFLP, Malone *et al.* (2005a) identificaram uma taxa de polimorfismo de 82,4%.

O PIC variou de 0 (zero) até 0,9706, com uma média de 0,53 (Tabela 2.2). Esse valor é similar ao estimado por Ni *et al.* (2002), que analisando cultivares de arroz das subespécies Indica e Japônica detectaram um valor médio de PIC de 0,62. Dos 19 primers analisados, 17 amplificaram mais de uma banda por genótipo, evidenciando que existe um elevado grau de heterozigose e variabilidade genética entre os ecótipos estudados, com destaque para os locos RM202, RM212 e RM 223, os quais apresentaram apenas um alelo no ecótipo 45. Da mesma forma, o loco RM205 apresentou um alelo somente nos ecótipos 3 e 45. Seguindo o raciocínio, o ecótipo 26 foi o único em apresentar um alelo no loco RM207 e o ecótipo 31, o único em apresentar um alelo no loco RM220. Dos 55 alelos analisados, 9 estiveram presentes em apenas um genótipo. Isto indica o grande índice de polimorfismo e heterozigose presente na população de arroz daninho analisada.

A similaridade genética, estimada com base no coeficiente de Nei & Li (1959), variou de 0,50 até 1,00, com distância genética média de 0,81.

**TABELA 2.2** – Frequência e valores de PIC (*Polymorphism Information Content*) para cada um dos 55 alelos microssatélite analisados. UFPel/Pelotas, 2006.

Loco microssatélite	Cromossomo	Alelo	PIC
RM55	3	1	0,9412
		2	0,7059
		3	0,1471
RM81	1	1	0,9706
		2	0,7941
RM202	11	1	0,0588
		2	0,9706
		3	0,8529
RM205	9	1	0,5588
		2	0,1471
		3	0,9706
		4	0,0882
RM207	2	1	0,0588
		2	0,8824
		3	0,9412
RM210	8	1	0,2353
		2	0,9412
		3	0,2941
RM212	1	1	0,4706
		2	0,9706
		3	0,1176
RM219	9	1	0,9706
		2	0,0882
		3	0,0000
RM220	1	1	0,9706
		2	0,0294
		3	0,8824
		4	0,1764
RM222	10	1	0,0294
		1	0,9706
		2	0,9706
		3	0,9706
RM223	8	4	0,0588
		1	0,3824
		2	0,3235
		3	0,2059
RM232	3	4	0,9118
		1	0,0294
		2	0,9706
		3	0,0000
RM233	2	3	0,0000
		1	0,8824
		2	0,9706
RM234	7	3	0,0588
		1	0,0294
		2	0,9706
RM239	10	1	0,0294
		1	0,9710
		2	0,8529
		3	0,1471
RM241	4	3	0,1471
		1	0,9706
		2	0,0294
RM247	12	2	0,0294
		1	0,9706
		2	0,1176
RM249	5	3	0,7941
		1	0,9706
		2	0,1176
RM261	4	1	0,9706
		2	0,0588

*RM* – Rice Microsatellite

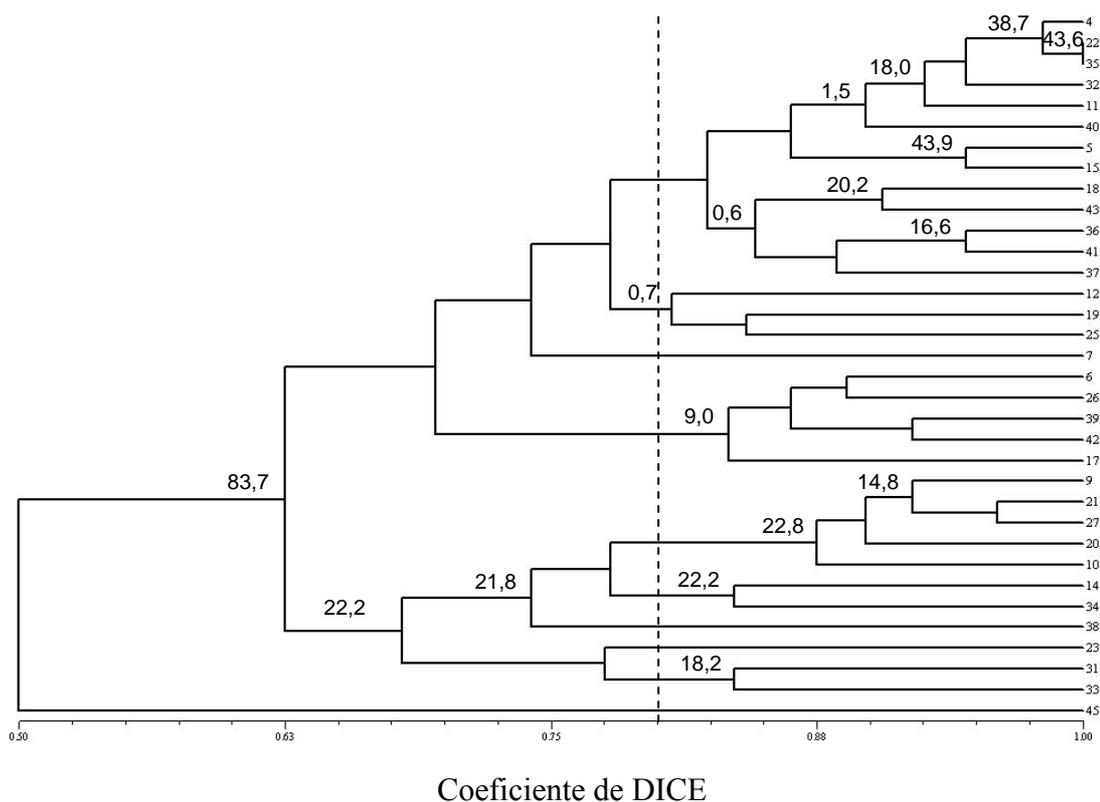
*PIC* – Polymorphism Information Content

A análise de agrupamento mediante o método de ligação completa utilizando a distância genética média como ponto de corte para a formação dos grupos, permitiu definir 10 agrupações de ecótipos, com destaque aos ecótipos 7, 38 e 45 que permaneceram formando grupos únicos, com apenas um genótipo (Figura 2.1).

Por outro lado, os valores de bootstrapping permitiram visualizar algumas agrupações diferentes das obtidas com base na similaridade genética média. Como exemplo, o agrupamento mais consistente, com valor de bootstrapping de 83,7 foi o agrupamento do ecótipo 45 com os ecótipos restantes.

Os demais agrupamentos consistentes com base em análise de bootstrapping foram, na maioria dos casos, conformados por apenas dois genótipos, sendo que os valores mais baixos foram obtidos para os agrupamentos estabelecidos pela similaridade genética média (Figura 2.1).

Dos 55 alelos identificados pela técnica microsatélite, 26 apresentaram frequências inferiores a 25%, evidenciando ampla variabilidade alélica entre os ecótipos estudados. Além disso, os 9 alelos únicos para apenas um genótipo, contribuíram de maneira significativa para a separação dos genótipos nos diferentes grupos. A ocorrência de vários alelos únicos pode ser um indicativo da alta taxa de mutação nos loci SSR e de recombinações desiguais, o que pode gerar novos alelos (Henderson & Petes, 1992).



----- Similaridade Genética Média

**FIGURA 2.1** - Dendrograma obtido com base na similaridade genético-molecular utilizando 55 marcadores microssatélites. O agrupamento foi obtido utilizando o método ligação completa.

#### *Análise isoenzimática*

Os seis sistemas enzimáticos analisados detectaram 23 alelos isoenzimáticos, dos quais, 21 foram polimórficos (91,30%). O número de alelos detectados variou de dois para Álcool Deshidrogenase (ADH) até cinco para o sistema Malato Deshidrogenase (MDH). Para Esterase (EST), os resultados obtidos concordam com Wu *et al.* (2005), os quais, analisando isoenzimas de Esterase em 848 acessos de arroz, concluíram que a maioria deles apresentava de duas a quatro bandas eletroforéticas. Este sistema enzimático tem sido o mais estudado em arroz (Endo & Morishima, 1983). Para Malato Deshidrogenase (MDH), o número de alelos identificados foi superior ao pesquisado por Lizhi *et al.* (2002), que analisando 149 acessos de arroz selvagem identificaram três alelos para o sistema MDH. O número de alelos encontrados para Fosfatase Ácida (ACP) foi inferior ao encontrado por Guidolin (1993) e Bonow *et al.* (2000) os quais

estudando os padrões isoenzimáticos em plântulas de arroz de oito dias identificaram sete alelos para FAC. Provavelmente, em função de terem analisado acessos de arroz preto e variedades comerciais, o que acrescenta maior variabilidade genética ao estudo. O conteúdo alélico do sistema Glutamato Deshidrogenase (GDH) foi superior ao pesquisado por Lizhi *et al.* (2002), que identificaram apenas um alelo para GDH em arroz. Por outro lado, Kanamori *et al.* (1972) identificaram maior intensidade de expressão da GDH em plântulas de duas semanas de idade com adição de amônio na solução de cultivo.

Para a análise isoenzimática, o PIC variou de 0 (zero) para o alelo cinco de ACP e o alelo três de GOT, até 0,971 para o alelo quatro de ACP (Tabela 2.3).

**TABELA 2.3** – Frequência e valores de PIC (*Polymorphism Information Content*) para cada um dos 23 alelos isoenzimáticos analisados. UFPel/Pelotas, 2006.

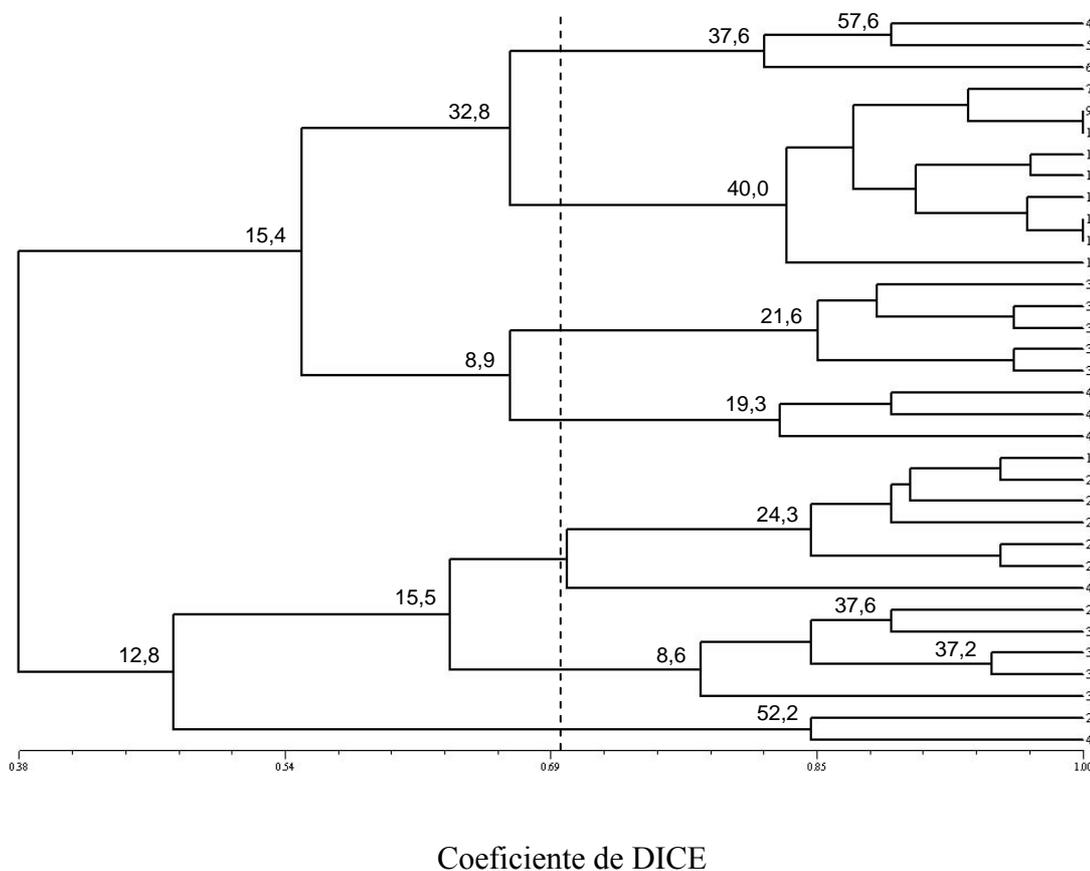
Sistema isoenzimático	Alelo	PIC
EST	1	0,824
	2	0,735
	3	0,088
	4	0,176
MDH	1	0,412
	2	0,500
	3	0,647
	4	0,353
	5	0,588
ACP	1	0,765
	2	0,912
	3	0,412
	4	0,971
	5	0,000
ADH	1	0,029
	2	0,265
GOT	1	0,029
	2	0,382
	3	0,000
GTDH	1	0,94
	2	0,441
	3	0,853
	4	0,824

*EST* – Esterase; *MDH* – Malato Deshidrogenase; *ACP* – Fosfatase Ácida; *ADH* – Álcool Deshidrogenase; *GOT* – Glutamato Oxalacetato Transaminase e *GTDH* – Glutamato Deshidrogenase.

*PIC* – Polymorphism Information Content

O cálculo do PIC em análises isoenzimáticas não tem sido muito utilizado, no entanto, gera uma informação valiosa para estudos de caracterização da variabilidade existente. O conteúdo alélico encontrado em cada sistema isoenzimático foi, em alguns

casos, superior ao citado na literatura. Isso poderá ter uma relação direta com a variabilidade genética da população natural de ecótipos de arroz vermelho analisada.



**FIGURA 2.2** - Dendrograma obtido com base na similaridade genético-molecular utilizando 23 marcadores isoenzimáticos. O agrupamento foi obtido utilizando o método ligação completa.

A similaridade genética, estimada com base no coeficiente de Nei & Li (1959), variou de 0,38 até 1,00, com distância genética média de 0,70, evidenciando maior variabilidade genética revelada mediante a análise isoenzimática. A análise de agrupamento mediante o método de ligação completa, e utilizando a similaridade genética média como ponto de corte para a formação dos grupos, permitiu definir sete agrupações de ecótipos. A análise de agrupamento com base em *bootstrapping*, novamente, não refletiu os agrupamentos obtidos com base na similaridade genética média como os mais consistentes. No entanto, a coincidência de agrupamentos

utilizando os dois parâmetros (similaridade genética média e *bootstrapping*) foi maior para as isoenzimas que para os marcadores microssatélite. Isto pode estar associado com o valor das matrizes cofenéticas obtidas para ambas as técnicas. Enquanto que para a análise de microssatélite foi obtido um valor de correlação cofenética de 0,68, para a análise isoenzimática o valor da matriz cofenética foi de 0,96, evidenciando que o dendrograma obtido com dados isoenzimáticos reflete de forma mais confiável os dados de similaridade genética entre os genótipos e, conseqüentemente, a formação dos grupos pode ser inferida com maior segurança. Contudo, para o caso das isoenzimas nenhum ecótipo permaneceu formando grupo único, e sim, todos eles formando agrupamentos de pelo menos dois ecótipos (Figura 2.2). Isto pode ser devido à utilização de apenas 23 alelos isoenzimáticos na caracterização dos ecótipos, pois na análise de microssatélite, o dobro do número de alelos foi identificado.

### *Discussão*

Ambos os sistemas de detecção de polimorfismo revelaram elevado grau de polimorfismo na população de arroz vermelho analisada. No entanto, o número e a composição genotípica de cada agrupamento obtido foram diferentes para ambos os tipos de marcadores genéticos. Provavelmente, isto é decorrente da variação nas regiões genômicas acessadas por cada técnica. Enquanto que os microssatélites revelam o polimorfismo com base em seqüências repetitivas (geralmente correspondentes a regiões do genoma que não codificam para proteínas), as isoenzimas revelam o produto direto da expressão gênica. Contudo, ambas as técnicas foram eficientes na diferenciação dos genótipos. Por outro lado, foi possível visualizar uma variação considerável na formação dos grupos quando utilizada a similaridade genética média comparada com a análise de bootstrapping. Infere-se que a análise de bootstrapping permite a formação de grupos de forma mais consistente do que com a utilização da similaridade genética média. Isto pode ser devido à metodologia de amostragem aleatória da análise por bootstrapping, onde os genótipos são escolhidos ao acaso durante 1000 vezes e é calculada a porcentagem de vezes que os genótipos agrupam juntos.

Realizando uma análise mais detalhada, pode-se observar que os ecótipos 45 e 26 foram os únicos que apresentaram atividade para o alelo 1 da enzima Glutamato Deshidrogenase (GTDH). O elevado valor de PIC para o referido alelo (0,94), pode ter sido o fator determinante para a separação destes ecótipos. Da mesma forma, o ecótipo

45, quando analisado mediante marcadores microssatélites, apresentou 3 marcadores que foram exclusivos deste ecótipo (alelo 2 do primer do RM 202, alelo 2 do primer do RM 212 e o alelo 1 do primer RM 223). Os valores de PIC (0,9706) contribuíram para que o ecótipo 45 formasse um grupo distinto dos demais ecótipos. Este ecótipo apresentou desempenho superior em análises de germinação a 20 cm de profundidade no solo (Sguarezi *et al.*, 2003). Com base neste resultado, o ecótipo 45 poderá ser utilizado para geração de uma população segregante para o caráter germinação/emergência a grandes profundidades, mediante o cruzamento com cultivares comerciais, com o objetivo de mapear QTLs associados. A eluição e Seqüenciamento de marcadores únicos para o ecótipo 45, também poderá ser importante na identificação de regiões genômicas associadas com o processo de germinação das sementes de arroz a grandes profundidades no solo.

## 2.6. CONCLUSÕES

- A população de arroz vermelho analisada apresenta variabilidade genética, capaz de evidenciar sua potencialidade para o mapeamento de características de interesse à fisiologia de sementes;

- A utilização do ecótipo 45 é recomendável para a obtenção de uma população segregante para o caráter germinação/emergência em grandes profundidades no solo.

### **3. CAPÍTULO II**

#### **IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NUCLEOTÍDICOS SIMPLES (SNPs) NO GENE $\alpha$ -AMILASE AMY1 DE ARROZ VERMELHO: EFEITO NO FENÓTIPO DO VIGOR DE PLÂNTULA**

### 3.1. RESUMO

A identificação de fenótipos diferentes é freqüentemente detectada em plantas domesticadas apesar da existência de fenótipos sem variabilidade nas formas selvagens. Um dos exemplos para a cultura de arroz é a ocorrência de uma amplitude de cores do pericarpo devida à pigmentação por antocianinas. O arroz vermelho tem provado ser uma fonte de genes muito valiosa, a qual se tem perdido ao longo dos processos de domesticação e hibridação. Portanto, a caracterização genética associada a estudos fenotípicos e fisiológicos em arroz vermelho possibilitaria elucidar caracteres de interesse para o arroz cultivado. Uma ampla variabilidade para ambos os níveis, genético e fisiológico, tem sido identificada em ecótipos de arroz vermelho da região Sul do Brasil, para caracteres tais como o processo de germinação. Neste estudo foram achados polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) em três regiões internas (483 pb do intron 1, 460 pb do intron 1 e 461 pb do exon 2) do gene  $\alpha$ -amilase AMY1, numa coleção de 30 ecótipos de arroz vermelho pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Pelotas, Brasil. Oito deles apresentaram haplótipos mutantes na região codificadora. Os SNPs são descritos através da seqüência deduzida de aminoácidos, e discutido o possível impacto da substituição de aminoácidos no caráter vigor de plântula. Foi possível identificar cinco SNPs no exon 2. Três desses SNPs apresentaram-se na mesma região, indicando um sítio quente ou “hot spot” putativo. Considera-se que a realização de análises de expressão de genes e proteínas, associadas a estudos fenotípicos e fisiológicos, é essencial para a identificação do efeito do gene  $\alpha$ -amilase AMY1 em arroz.

Palavras-chave: seqüenciamento de DNA, metabolismo de carboidratos, germinação, vigor.

### 3.2. ABSTRACT

Red rice is a major competitor of cultivate rice in Brazil, could reach 80-90% of infestation when cultural practices are not properly applied. The annual damage overcomes US\$ 100 million, considering the losses in the rice productive chain. On the other hand, the red rice constitutes in a collection of lost genes during breeding of the cultivated rice and has a fundamental importance for recovering promising genetics constitutions. I shares important morphologic and physiologic characteristics with the cultivated rice. Gene mapping, genome sequencing and gene prospection projects are contributing to that. This work has the objective to analyze the genetic variability of an red rice ecotypes collection (*Oryza sativa* L.) from Rio Grande do Sul state (Brazil), through isoenzymatics and microsatelites markers. Thirty four ecotypes, from the germplasm bank of Laboratorio de Sementes e Biotecnología (FAEM/UFPel), were analyzed using 6 isoenzymatics systems and 19 microsatelites markers. Twenty three biochemical and 55 moleculars alleles were identified and used to estimate the polymorphism (PIC) and genetic similarity indexes. Both polymorphism system detection showed a wide polymorphism index thought red rice population, promising a great potential to genetic mapping of physiological seed traits.

Key-words: *Oryza sativa* L., biochemical markers, microsatélites markers, genetic variability.

### 3.3. INTRODUÇÃO

O processo de germinação envolve inúmeros eventos de caráter fisiológico e de desenvolvimento das sementes, dos quais muitos precisam ainda de serem esclarecidos. As  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -1,4 D glucanas glucana hidrolase, EC3.2.1.1) hidrolisam as uniões internas  $\alpha$ -1,4-glucosídicas do amido, maltodextrinas e maltooligosaccarídeos (Yamamoto, 1995). Várias classes de nomenclatura para as isoformas de  $\alpha$ -amilase e seus respectivos genes podem ser encontradas na bibliografia. Jones & Jacobsen (1991) classificaram o AMY1 como grupo de baixa pI  $\alpha$ -amilases, e AMY2 como grupo de alta pI  $\alpha$ -amilases. Rogers (1995) descreveu as altas pI e baixas pI  $\alpha$ -amilases como AmyA e AmyB, respectivamente. Huang *et al.* (1992) dividiram os genes pI  $\alpha$ -amilase em Triticale em três sub-famílias, Amy1, Amy2 e Amy3. Uma subfamília adicional de genes amilase (Amy3) tem sido identificada em trigo (Huang *et al.* 1992). Alguns autores (Rogers & Milliman, 1984; Whittier *et al.*, 1987) nomearam genes de isoenzimas baixa pI como classe A e como classe B os genes das isoenzimas alta pI. No entanto, a maioria dos autores (Kox *et al.*, 1987; Zwickert *et al.*, 1996; Rondenburg *et al.*, 2000) se referem às famílias de genes de isoenzimas como Amy1 (alta pI=  $\alpha$ -amilase 2) e Amy2 (baixa pI=  $\alpha$ -amilase 1). No arroz, pelo menos três genes  $\alpha$ -amilase são expressos durante os processos da germinação/emergência (Daussant *et al.*, 1983), sendo que fazem parte de uma família de multigenes composta por dez genes (Huang *et al.*, 1990<sup>a</sup>; Sutliff *et al.*, 1991), localizados em cinco cromossomos do arroz (Rahnjan *et al.*, 1991).

O gene  $\alpha$ -amilase AMY1 (EC3.2.1.1) está localizado no cromossomo 2 do arroz, sendo expresso em alto nível nas células de aleurona durante a germinação; o gene está sob controle do fitohormônio ácido giberélico. O mesmo gene é também

expresso, em baixo nível, em grãos em desenvolvimento, sendo importante para a quebra do amido do endosperma durante a germinação.

No arroz, o índice de germinação quanto o crescimento precoce da plântula são bons parâmetros do vigor das sementes, os quais podem ser quantificados com base no alongamento da parte aérea, raiz, coleótilo e mesocótilo (Redoma & Mackill, 1996; Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). No arroz quanto em outros cereais, os caracteres mais comumente ligados ao vigor de plântula estão intimamente relacionados à atividade das amilases,  $\alpha$ -amilase, a qual reduz o conteúdo de açúcar quanto a atividade radicular (Cui *et al.*, 2002).

O polimorfismo nucleotídico simple (SNP), é uma seqüência variável de DNA que ocorre quando um nucleotídeo individual –A, T, C ou G- do genoma difere entre membros de uma mesma espécie. Por exemplo, dois fragmentos de DNA seqüenciados pertencentes a indivíduos diferentes, AAGCCTA ou AAGCTTA, possuem uma única diferença, no nível de um nucleotídeo.

Polimorfismos nucleotídico simple (SNP) representam uma variação genética natural de alta densidade nos genomas. Os SNPs podem ocorrer em regiões não codificadoras (SNPs) tanto quanto nas regiões codificadoras (cSNPs).

As variações na seqüência de DNA podem afetar na forma na qual as plantas desenvolvem resistência a moléstias, na forma de resposta a patógenos, agentes químicos, drogas, etc. Entretanto, sua maior importância na pesquisa biotecnológica dá-se na comparação de regiões do genoma entre coortes (como acontece com os pares de coortes com o sem um caráter fisiológico).

Nesse trabalho, polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) foram revelados em três regiões internas (dois introns e um exon) do gene  $\alpha$ -amilase AMY1 através de seqüenciamento. Os SNPs distinguiram cultivares dentre uma coleção de 30 ecótipos de arroz vermelho. Os SNPs identificados foram descritos com base na seqüência deduzida dos aminoácidos e alinhados com a seqüência gênica da cultivar Nipponbare (acessão GenBank: X16509; Huang *et al.*, 1990b), e discutido o possível impacto das substituições de aminoácidos na função protéica.

### 3.4. MATERIAL E MÉTODOS

#### *Material vegetal*

A coleção de 30 ecótipos de arroz vermelho utilizada nesse estudo foi obtida do banco de germoplasma do Laboratório de Sementes e Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, Brasil. As sementes foram plantadas no campo e as folhas jovens coletadas de bulks de dez plantas. O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo CTAB 2% (Saghai Maroof *et al.*, 1984).

#### *Amplificação por PCR*

Aproximadamente 50 ng de DNA genômico foram combinados com o buffer 10X PCR, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, cada dNTP a 200 µM, cada primer a 0.1 µM, e 1 U Taq polimerase, num volume total de reação de 20 µl. A reação de PCR foi executada durante um período de três minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 56°C, 45 segundos a 72°C e uma incubação final de dez minutos a 72°C, utilizando o termociclador MJ Research PTC-100.

Três regiões internas do gene foram amplificadas (483, 460 e 461 pb, respectivamente). A região de 483 pb do intron 1 foi amplificada por PCR utilizando primers nas posições 213 pb e 696 pb (incluindo as seqüências dos primers), na seqüência genômica do Amy1 (acessão GenBank: X16509). As seqüências dos primers foram as seguintes: 5'AAAGCTGTTCTGTTAAGTCGGTTCC3' (Sense) e 5'TCCTGTTGCCATGCACATTTTAG3' (Antisense). A região de 460 pb do intron 1 foi amplificada por PCR utilizando os primers na posição 1404 pb e na posição 1864 pb (incluindo as seqüências dos primers), na seqüência genômica do Amy1 (acessão GenBank: X16509).

As seqüências dos primers foram as seguintes: 5'ATTGTGGCACCTTTAGGTACCTTCT3' (Sense) e 5'TTGAACGTGCGCGTGTA AAAA3' (Antisense). A região de 461 bp do exon 2 foi amplificada por PCR utilizando primers nas posições 2710 pb e 3172 pb (incluindo as seqüências dos primers) na seqüência genômica do Amy1 (acessão GenBank: X16509). As seqüências dos primers foram as seguintes: 5'AAGGTGCGGTGCTCTGCTCT3' (Sense) e 5'GCCGATGTCCATCTTGAGCC3' (Antisense). Os produtos da PCR foram revelados através de nitrato de prata em gel de poliacrilamida (Briard *et al.*, 2000).

#### ***Análise de Sequenciamento***

Uma porção de gel seco contendo as bandas dos três fragmentos foram extraídas e embebidas em 20 ml de H<sub>2</sub>O e colocadas sobre gelo por um período de dez minutos. Logo de uma centrifugação breve, o sobrenadante foi utilizado numa nova amplificação, a qual foi desenvolvida em 20 µl de uma mistura de reação, utilizando o mesmo coquetel e programa de PCR, junto com 5 µl de DNA recuperado no primeiro passo.

Logo da PCR, uma porção (15 µl) da mistura foi analisada num gel de agarose 2% (w/v). A mistura remanescente foi utilizada na reação de seqüenciamento. A análise da seqüência foi executada através do método "Dye Terminator" (BigDye version 2.0) utilizando um sistema de seqüenciamento ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Warrington, UK). Ambas as fitas de DNA dos produtos da PCR foram seqüenciados três vezes.

#### ***Identificação de SNPs***

O gene AMY1 da  $\alpha$ -amilase da cultivar de arroz Nipponbare (acessão GenBank: X16509, Huang *et al.*, 1990b) e as seqüências dos três fragmentos pertencentes a 30 ecótipos foram analisados através de alinhamentos múltiplos, empregando o programa ClustalW (Higgins *et al.*, 1996).

Os SNPs foram identificados mediante análise visual, enquanto as mutações e os efeitos das substituições de aminoácidos sobre a estrutura tridimensional e função biológica das proteínas foram identificadas utilizando o programa de visualização SWISS-PDB (Guex & Peitsch, 1997).

#### ***Alinhamentos múltiplos e seqüências protéicas***

Utilizou-se a seqüência conhecida do gene  $\alpha$ -amilase AMY1 do DNA genômico da cultivar de arroz Nipponbare (acessão GenBank: X16509, Huang *et al.*, 1990b), para executar a BLAST-X com o intuito de identificar seqüências protéicas

semelhantes. O alinhamento múltiplo foi aplicado entre a seqüência conhecida da proteína AMY1 (GI X16509) e a seqüência de proteína  $\alpha$ -amilase obtida no PDB.

### 3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Variabilidade nos nucleotídeos do gene $\alpha$ -amilase AMY1*

Dos 30 ecótipos de arroz vermelho analisados, só oito apresentaram variação de nucleotídeo único na região codificadora de 461 pb, no exon 2 do gene  $\alpha$ -amilase AMY1 (Figura 3.1). Um número expressivo de mutações silenciosas de nucleotídeos foram identificadas nas regiões não codificadoras (dados não apresentados), devido ao fato das regiões de introns não serem traduzidas em proteínas, portanto, não ficam expostas à pressão de seleção. Essas mutações não foram consideradas no estudo, desde que geralmente não exercem efeitos na estrutura nem na função da proteína AMY1.

#### *Alinhamentos múltiplos das seqüências protéicas*

As análises de alinhamento múltiplo entre a proteína  $\alpha$ -amilase AMY1 (GI X16509) da cultivar Nipponbare e as seqüências das proteínas  $\alpha$ -amilase achadas no PDB, permitiram a identificação de uma proteína  $\alpha$ -amilase 1AMY em cevada (Kadziola *et al.*, 1994), num nível de similaridade de 99% (Figura 3.2). Os polimorfismos de aminoácidos entre a proteína AMY1 de a cultivar Nipponbare e 1AMY da cevada foram desconsideradas na análise dos ecótipos de arroz vermelho.

```

Nippombare      GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
Ecotype 2      GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
Ecotype 14     GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
Ecotype 9      GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
Ecotype 12     GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
Ecotype 4      GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
Ecotype 7      GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
Ecotype 5      GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
Ecotype 18     GCTACATGCCTGGGCGGCTGTACCGATCTGGACGCGTCTAAGTACGGCAACGAGGCGCAGC 60
*****

Nippombare      TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
Ecotype 2      TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
Ecotype 14     TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
Ecotype 9      TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
Ecotype 12     TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
Ecotype 4      TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
Ecotype 7      TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
Ecotype 5      TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
Ecotype 18     TCAAGTCGCTGATCGAGGCGTTCCATGGCAAGGGCGTCCAGGTGATCGCCGACATCGTCA 120
*****

Nippombare      TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
Ecotype 2      TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
Ecotype 14     TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
Ecotype 9      TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
Ecotype 12     TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
Ecotype 4      TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
Ecotype 7      TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
Ecotype 5      TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
Ecotype 18     TCAATCCACCGCACGGCGGAGCACAAGGAC 149
*** ** *****

```

**FIGURA 3.1** – Alinhamento parcial das seqüências do gene AMY1 em oito ecótipos de arroz vermelho e da cultivar Nipponbare. As caixas indicam as seis regiões codificadoras com polimorfismos nucleotídicos simples (cSNP).

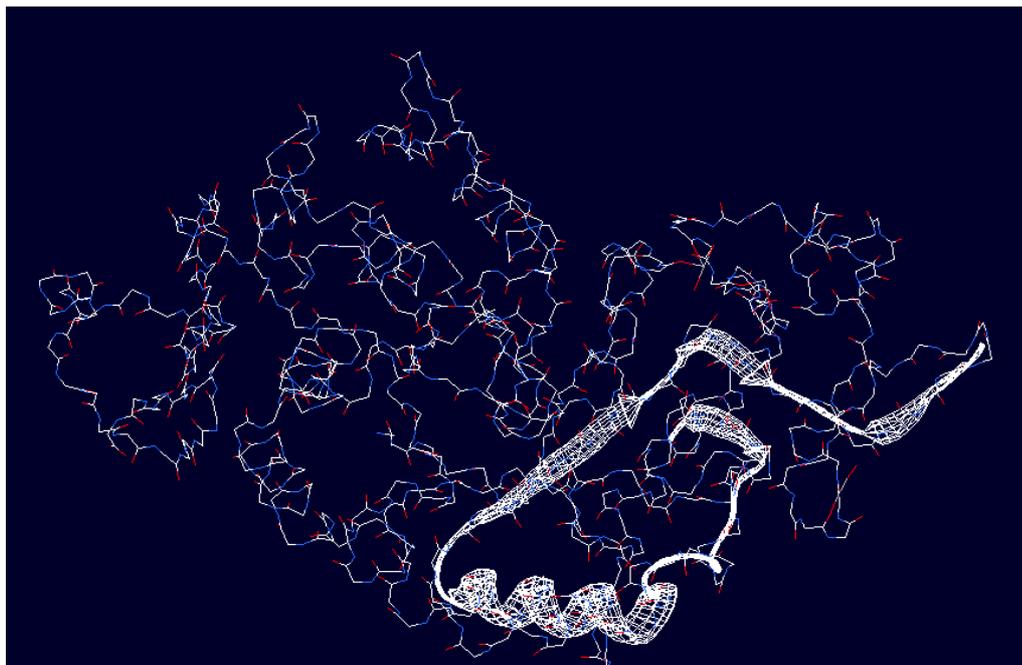
```

1AMY - Barley      YMPGRLYDL DASKYGNFAQLKSLIEAHHGKGVVFIADIVINHRTAEHKD 100
Nippombare - Rice YMPGRLYDL DASKYGNFAQLKSLIEAHHGKGVVFIADIVINHRTAEHKD 49
*****

```

**FIGURA 3.2** – Alinhamento parcial entre a seqüência conhecida da proteína  $\alpha$ -amilase AMY1 da cultivar de arroz Nipponbare e a proteína  $\alpha$ -amilase 1AMY da cevada. Os polimorfismos de aminoácidos (caixas) entre AMY1 e 1AMY foram desconsiderados na análise de ecótipos de arroz vermelho.

Somente os polimorfismos de aminoácidos entre as proteínas 1AMY da cevada e as dos ecótipos de arroz vermelho, e os monomórficos entre a proteína AMY1 da cultivar Nipponbare e a 1AMY da cevada foram analisados. Através da disponibilidade da estrutura tridimensional da proteína 1AMY da cevada foi possível a análise dos efeitos de substituição de aminoácidos na função biológica da proteína  $\alpha$ -amilase AMY1 do arroz (Figura 3.3).



**FIGURA 3.3** – O programa de visualização gráfica SWISS-PDB foi utilizado para simular o efeito da substituição de aminoácidos no gene  $\alpha$ -amilase AMY1 do arroz vermelho. A porção do exon 2 analisada nesse estudo aparece em destaque.

No caso dos oito ecótipos mutantes, as seqüências foram traduzidas em proteínas e os alinhamentos executados para identificar os efeitos das mutações na composição de aminoácidos da proteína e na sua estrutura tridimensional. Os alinhamentos múltiplos permitiram a identificação de seis pontos de polimorfismos, compondo sete haplótipos diferentes (Tabela 3.1). Desses, três foram localizados na mesma região do exon 2 (posições 91, 92 e 97) indicando um “hot spot” ou sítio quente putativo (Figura 3.4).

De todos os SNPs detectados, só um resultou um aminoácido sinônimo (His→Arg na posição 92). No entanto, foi possível identificar que os oito ecótipos apresentaram o mesmo tipo de mutação na posição 91(Asn→Ile). Ainda, na posição 92, cinco dos oito ecótipos mutantes evidenciaram a substituição de His→Leu.

Ambas as mutações, que causaram a substituição de um aminoácido polar (Asn) por um não polar alifático (Ile) e de um aminoácido com carga positiva (His) por um aminoácido não polar com carga negativa (Leu), poderiam ter originado um extremo não polar (hidrofóbico), com a capacidade de modificar a estrutura tridimensional da proteína e, como consequência, de sua função catalítica. Além do mais, a substituição

do His, o qual possui um grupo imidazole, pelo Pro na posição 97 em três dos oito ecótipos mutantes poderia ter originado modificações estruturais relevantes. Isso aconteceria desde que um aminoácido complexo (His) fosse substituído por um aminoácido pequeno (Pro), o qual apresenta um grupo amino secundário (imino) retido numa conformação extremamente rígida, o que reduz a flexibilidade estrutural da proteína nesse ponto. Tal modificação não foi verificada.

**TABELA 3.1** – Alterações de nucleotídeos e substituição de aminoácidos no gene  $\alpha$ -amylase AMY1 em oito ecótipos de arroz vermelho. UFPel/Pelotas, 2006.

Acessão	Posição	Mutação	Efeito na proteína
Ecótipo 2	92	T→A	Substituição (Leu→His) no segundo exon
Ecótipo 4	91	T→C	Substituição (Asn→Ile) no segundo exon
	92	G→A	Substituição (Arg→His) no segundo exon
	97	C→A	Substituição (Pro→His) no segundo exon
Ecótipo 5	91	T→A	Substituição (Asn→Ile) no segundo exon
	92	T→A	Substituição (Leu→His) no segundo exon
	97	C→A	Substituição (Pro→His) no segundo exon
Ecótipo 7	91	T→A	Substituição (Asn→Ile) no segundo exon
	92	G→A	Substituição (Arg→His) no segundo exon
	97	T→A	Substituição (Leu→His) no segundo exon
Ecótipo 9	57	C→A	Substituição (Tyr→Ser) no segundo exon
	91	T→A	Substituição (Asn→Ile) no segundo exon
	92	T→A	Substituição (Leu→His) no segundo exon
Ecótipo 12	91	T→A	Substituição (Asn→Ile) no segundo exon
	92	T→A	Substituição (Leu→His) no segundo exon
Ecótipo 14	91	T→A	Substituição (Asn→Ile) no segundo exon
Ecótipo 18	85,	C→T	Substituição (Thr→Ile) no segundo exon
	91	T→A	Substituição (Asn→Ile) no segundo exon
	92	T→A	Substituição (Leu→His) no segundo exon
	97	C→A	Substituição (Pro→His) no segundo exon

As duas mutações remanescentes (Tyr→Ser na posição 57, do ecótipo 9 e Thr→Ile na posição 85, do ecótipo 18) também originaram substituições de aminoácidos polares por aminoácidos não polares. É de interesse comentar ao respeito de um outro acontecimento, o caso especial com o ecótipo 9, no qual ocorreu a substituição do aminoácido Tyr, com um grupo R complexo e extremamente hidrofóbico, por o aminoácido Ser, com um grupo R simples e caráter hidrofílico.

Nippombare	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVIN	IRRTAEH	PKD	49
Ecotype 4	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVII	IRRTAEH	PKD	49
Ecotype 7	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVII	IRRTAEH	LKD	49
Ecotype 5	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVII	IRRTAEH	PKD	49
Ecotype 18	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVII	IRRTAEH	PKD	49
Ecotype 9	YMPGRISD	LASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVII	IRRTAEH	PKD	49
Ecotype 12	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVII	IRRTAEH	PKD	49
Ecotype 14	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVII	IRRTAEH	PKD	49
Ecotype 11	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVIN	IRRTAEH	PKD	49
Ecotype 2	YMPGRLYDL	DASKYGNEAQLKSLIEAFHGKGVQV	IADIVIN	IRRTAEH	PKD	49

\*\*\*\*\*

**FIGURA 3.4** – Alinhamento parcial das seqüências do exon 2 da proteína  $\alpha$ -amilase Amy1 em oito ecótipos de arroz vermelho e a cultivar de arroz Nipponbare. As caixas referem aos cinco pontos de substituição de aminoácidos.

### *Associação entre as mutações e o fenótipo*

Os estudos preliminares têm mostrado a existência de variabilidade genética ampla entre genótipos de arroz vermelho para os caracteres germinação e emergência (Sguarezi, 2004). Essa variabilidade genética está relacionada com outros caracteres fisiológicos de importância no controle da germinação e vigor nas sementes, como a síntese de ácido abscísico (ABA) e do ácido giberélico (AG), tolerância ao frio durante a fase de germinação e alongamento do coleótilo e do mesocótilo (Redoña & Mackill, 1996; Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005).

Por causa dessas interações é que resulta extremamente difícil estabelecer correlações entre a variação alélica e o fenótipo observado pela ação de um gene individual. Resulta, portanto, muito importante poder desenvolver testes fisiológicos e fenotípicos com antelação, de forma de possuir a necessária precisão e exatidão no estabelecimento da correlação fenotípica.

Um estudo comparativo entre a qualidade fisiológica e os efeitos da variabilidade alélica foi desenvolvido para oito ecótipos mutantes arroz vermelho (dados não apresentados). A mesma coleção de ecótipos foi analisada através de testes fisiológicos e de vigor, tais como o teste de germinação, tolerância ao frio durante fase de germinação, envelhecimento acelerado e velocidade de germinação e emergência quando semeada a profundidade maior da normal (Sguarezi, 2004). Os resultados mostraram que todos os mutantes apresentaram um desempenho fisiológico subótimo, quando testados para atributos de vigor. Esses resultados sugerem que o gene  $\alpha$ -amilase AMY1 exerce um hipotético efeito no processo de germinação de sementes de arroz, exercendo um possível efeito direto sobre caracteres relacionados ao vigor.

A pesar dos estudos sobre a expressão gênica diferenciada, utilizando mRNA, ainda não terem sido executados, é suficientemente aceita a existência de uma correlação positiva entre genes  $\alpha$ -amilase e o caráter vigor de sementes. Vários pesquisadores têm tentado o mapeamento de locos controladores de características quantitativas (QTLs) para o caráter vigor de plântula, utilizando linhas recombinantes e retrocruzadas de arroz (Redoña & Mackill, 1996; Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005).

Num estudo inicial, treze QTLs diferentes têm sido identificados e mapeados, em sete cromossomos diferentes (Redoña & Mackill, 1996). Quatro QTLs controlam o comprimento dos afilhos, dois controlam o comprimento de raízes e mais dois o comprimento do coleóptilo, enquanto os restantes cinco locos controlam o comprimento do mesocótilo. Vários QTLs adicionais têm sido posteriormente identificados (Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005) e poderão ser considerados como ponto de partida para a clonagem baseada no mapeamento.

Presumivelmente, um número bastante elevado de genes estão envolvidos no controle do caráter vigor de plântula no arroz. Futuras análises de genes  $\alpha$ -amilase deveriam prover a informação necessária para a melhor compreensão da função desses genes no arroz quanto para outros integrantes da família *Poaceae*. As seqüências gênicas poderiam ser utilizadas como marcadores moleculares em programas de seleção assistida por marcadores.

Além da correlação positiva observada entre a expressão do gene  $\alpha$ -amilase e o caráter vigor de plântula, nenhuns outros genes controlando esse caráter têm sido clonados a partir do arroz.

### 3.6. CONCLUSÃO

- O gene  $\alpha$ -amilase AMY1 apresenta variabilidade na coleção de arroz vermelho avaliada, apresentando mutantes que poderiam afetar a estrutura protéica quanto a expressão fenotípica.

#### **4. CAPÍTULO III**

### **REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À GERMINAÇÃO/EMERGÊNCIA DE SEMENTES DE ARROZ A GRANDES PROFUNDIDADES DO SOLO**

#### 4.1. RESUMO

Muitos dos atributos fisiológicos das sementes estão estreitamente relacionados com a composição genética da cultivar. A utilização de variedades de arroz vermelho, de ampla base genética, em cruzamentos direcionados com variedades comerciais, possibilita a obtenção de grandes populações segregantes para a identificação de QTLs associados com qualidade fisiológica das sementes. O desenvolvimento de rápidas e eficientes técnicas de biotecnologia e marcadores moleculares tem auxiliado consideravelmente este processo. No presente trabalho, uma população segregante proveniente do cruzamento entre o ecótipo de arroz vermelho FFS-45 (com o caráter germinação/emergência em grandes profundidades) e a cultivar BRS 7 "taim" (sem o caráter) foi utilizada para a identificação de marcadores moleculares do tipo microssatélite associados a vigor de sementes. Os marcadores identificados foram utilizados para a prospecção de genes nas regiões genômicas correspondentes. O estudo permitiu a identificação de cinco marcadores moleculares associados ao caráter e a prospecção de 83 genes possivelmente relacionados com a expressão fenotípica do vigor de sementes em arroz.

Palavras-chave: marcadores moleculares, qualidade fisiológica, populações segregantes.

## 4.2. ABSTRACT

Various seed physiological attributes are close related with cultivar genetic composition. Using red rice ecotypes, with broad genetic variability, in specific crosses with commercial varieties, it's possible to generate large segregants populations for QTL identification for quality seed attributes. Development of rapid and efficient biotechnologies techniques has been helping it. In this work, a segregant population from FFS-45 red rice ecotype (with a trait for germination/emergence from great soil depths) and BRS 7"taim" (without the trait) was used to identify SSR markers linked with seed vigor. These markers were used to gene prospection from respective genomic regions. It was possible to identify five SSR markers linked to the trait of germination/emergence from great soil depht, and 83 putative genes involved in vigor seed phenotypic expression in rice.

Key-words: molecular markers, physiologic quality, segregant populations.

### 4.3. INTRODUÇÃO

O desempenho produtivo do arroz e das demais espécies de importância agrícola depende do número de plantas por unidade de área, altamente correlacionado com o vigor das sementes no solo. Tradicionalmente os programas de melhoramento genético não selecionaram de forma direta para caracteres associados à fisiologia de sementes o que contribuiu para o desenvolvimento de constituições genéticas superiores para produção de grãos, mas algumas vezes deficientes na capacidade de germinação e emergência no solo, principalmente sob condições adversas. O arroz daninho é uma fonte de variabilidade genética para o melhoramento do arroz e possivelmente para os demais cereais - devido a sintenia (Benetzen & Freeling, 1993; Gale & Devos, 1998; Bennetzen, 2002). O arroz daninho se constitui num acervo de genes que no arroz comercial foram perdidos durante o sucessivo processo de seleção, à que o arroz cultivado foi submetido na busca de adaptabilidade e produtividade, durante o melhoramento.

#### ***O arroz daninho e o vigor de sementes***

O vigor de sementes é, sem dúvidas, um dos mais importantes atributos agronômicos que garantem um adequado estande de plantas no campo, especialmente em cereais de clima temperado, onde fatores tais como: práticas de manejo ineficientes, ou temperaturas e umidade do solo inadequadas, impõem as sementes um estresse que influencia diretamente no crescimento e desenvolvimento das plântulas (Redoña & Mackill, 1996; Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). O melhoramento de caracteres associados à qualidade fisiológica das sementes se constitui atualmente no maior desafio dos programas de melhoramento. O problema é que o melhorista, simplesmente,

possui outras prioridades em alguns casos tem pouca compreensão do que a qualidade fisiológica da semente representa e qual a sua importância na produção da lavoura. Ganhar a atenção dos melhoristas tem sido a principal dificuldade (Delouche, 2006).

Em arroz, a porcentagem de germinação e a rápida emergência das plântulas no campo constituem-se nos dois atributos mais importantes que caracterizam a qualidade fisiológica das sementes. Estudos demonstram uma elevada variabilidade genética e molecular para esses caracteres em diferentes ecótipos de arroz vermelho, coletados em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul (Perreto, 1990, Sguarezi *et al.*, 2003, Malone *et al.*, 2005b), sendo uma excelente fonte de variabilidade genética para o melhoramento do arroz convencional.

Presume-se que um grande número de genes esteja envolvido na expressão do vigor de sementes. Com a obtenção de populações segregantes e a utilização de avançadas técnicas de biotecnologia e marcadores moleculares torna-se possível a localização e clonagem dos genes relacionados a um caráter específico de vigor, através da identificação prévia de marcadores moleculares associados ao caráter. Isto permite a realização de estudos mais aprofundados, possibilitando estudar a interação e expressão dos principais genes que determinam a qualidade fisiológica das sementes em arroz e outros cereais. Além disso, os marcadores identificados poderão ser utilizados em programas de Seleção Assistida por Marcadores Moleculares pelos programas de melhoramento.

Vários autores tem identificado e mapeado genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associados com vigor de sementes utilizando grandes populações segregantes e Linhas Endogâmicas Recombinantes (LERs) em arroz (Redoña & Mackill, 1996; Cui *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). O mapeamento e a identificação de marcadores moleculares associados com caracteres agrônômicos se constituem no ponto de partida para a clonagem posicional de genes, possibilitando desta forma, a disponibilização de novos genes aos programas de melhoramento.

### ***Marcadores moleculares e análise de QTLs em plantas***

A grande maioria das características quantitativas nas espécies cultivadas (componentes do rendimento, germinação/emergência, maturação fisiológica, etc.) é controlada por vários genes (mais de dois) que, na maioria dos casos são de pequeno efeito sobre o caráter. Ocasionalmente, genes de grande efeito têm sido identificados

(genes de maior efeito). Esses genes são denominados locos quantitativos - QTLs e podem ser facilmente identificados e caracterizados utilizando-se marcadores moleculares. Um QTL corresponde à região do cromossomo responsável por uma parte ou por toda a expressão da característica. Vários QTLs, em mais de um cromossomo, poderão ser identificados para uma única característica. Essas regiões cromossômicas são identificadas mediante análise de ligação com dois ou mais marcadores moleculares que o flanqueiam, embora possam ou não ser ligados ao QTL.

A principal dificuldade no mapeamento de QTLs é o fato de que vários genes estão interagindo com o ambiente e influenciando a expressão do caráter (fenótipo). É por isso, que o delineamento experimental utilizado deverá contemplar a genotipagem de um grande número de indivíduos ou famílias para permitirem uma associação precisa dos marcadores com os QTLs.

Os esforços realizados nos estudos de associação de marcadores moleculares á características de interesse, o que geralmente requer da genotipagem de grandes populações segregantes com centos de marcadores moleculares, tem incentivado o desenvolvimento de novas metodologias de seleção mais eficientes e efetivas. Desta forma surge a técnica chamada *DNA Pooling* (agrupações de DNA). Baseada na já conhecida técnica de BSA (*Bulk Segregant Analysis*), proposta por Michelmore *et al.*(1991), a metodologia *DNA Pooling* representa um ganho em economia e tempo, na realização de estudos de associação genotípica. Principalmente, devido a não realização de análises de DNA individuais (como as metodologias convencionais) e sim, agrupações (Pools) de DNA, provenientes de vários genótipos que apresentam uma determinada característica em comum. As vantagens da técnica são fáceis de serem percebidas. Em apenas duas amostras de DNA, uma população de 500 indivíduos segregantes para uma determinada característica pode ser analisada para centos de marcadores moleculares em apenas algumas reações de PCR.

A técnica *DNA Pooling* apresenta também características favoráveis para a estimativa de frequências alélicas associadas à QTLs, mediante a utilização dos extremos de uma população segregante.

Investir na elucidação de caracteres genéticos de importância para o entendimento dos processos fisiológicos de germinação/emergência de sementes no arroz pode ser decisivo também para outros cereais, ou inclusive na mesma espécie, já que o arroz

daninho não sofreu de forma tão intensa os efeitos do afinilamento genético a que o arroz cultivado foi submetido ao longo dos anos.

O objetivo deste estudo foi prospectar e caracterizar genes associados á germinação/emergência em grandes profundidades do solo em arroz, mediante a identificação de marcadores moleculares do tipo microssatélite.

#### 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a escolha dos genitores, foram utilizados dados de pesquisas anteriores, sendo uma coleção de arroz vermelho primeiramente analisada do ponto de vista fisiológico para identificar as constituições genéticas que apresentaram melhores resultados em condições de emergência a grandes profundidades do solo (Sguarezi *et al.*, 2003). Numa segunda etapa da caracterização da coleção do germoplasma, Malone *et al.* (2007), analisaram a mesma coleção de ecótipos para variabilidade genética utilizando marcadores moleculares e bioquímicos. Ambos os trabalhos contribuíram para a escolha do genótipo FFS-45, por apresentar desempenho superior quanto à germinação a grandes profundidades do solo (Sguarezi *et al.*, 2003) e um excelente potencial para hibridização (Malone, *et al.*, 2007). A cultivar BRS – 7”Taim” foi escolhida como o outro parental por apresentar um comportamento limitado de germinação em profundidades do solo maiores do que 5 cm.

Os cruzamentos entre o Ecótipo FFS-45 (caráter germinação / emergência a grandes profundidades) com o cultivar BRS 7 “Taim” (sem o caráter), foram realizados em setembro de 2004, em casa de vegetação da EMBRAPA Clima Temperado (CPACT). Para a montagem das populações de cruzamento, levou-se em consideração o fato de que o parental FFS-45, por não ser uma linha pura, poderia ainda apresentar algum índice de segregação. Para contornar o problema, as sementes do parental FFS-45 foram semeadas a 15 cm de profundidade, para garantir que as sementes que germinassem e emergissem apresentassem o caráter germinação/emergência em grandes profundidades. Visando um possível efeito materno na expressão do caráter, somente cruzamentos utilizando o genitor FFS-45 como mãe e o BRS 7 “Taim” como doador de

pólen foram realizados. Um total de 600 espiguetas foram emasculadas e polinizadas para a obtenção das sementes híbridas  $F_1$ . Estas sementes  $F_1$  foram semeadas novamente na estação da EMBRAPA Arroz e Feijão (CNPAF) em julho de 2005 para obtenção da população  $F_2$ .

O tamanho da população foi estimado em no mínimo 150 indivíduos, para garantir de que todos, ou pelo menos a grande maioria, dos recombinantes fossem obtidos.

A população de sementes  $F_2$  foi semeada em baldes, em novembro de 2005, em casa de vegetação da EMBRAPA Clima Temperado (CPACT), para a obtenção das famílias  $F_3$ . As sementes  $F_2$  foram primeiramente submetidas a tratamento de superação de dormência a 50°C durante 96 h (Brasil, 1992). Aproximadamente 30 dias após a semeadura em profundidade normal (5 cm), uma amostra de tecido foliar de cada planta  $F_2$  foi coletada para a extração de DNA, a qual foi realizada conforme protocolo descrito por Shagai-marooof *et al.* (1984).

Para a avaliação fisiológica das famílias  $F_3$ , 225 sementes de cada família foram semeadas a 15 cm de profundidade, em casa de vegetação. A metodologia adotada foi de tubos PVC de 75 mm de diâmetro, de 25 cm de comprimento previamente enterrados a 10 cm. Depois de colocadas as sementes, os tubos foram completados até o topo com mais 15 cm de solo (Figura 4.1).



**FIGURA 4.1** – Detalhes da montagem do teste fisiológico de germinação em grandes profundidades.

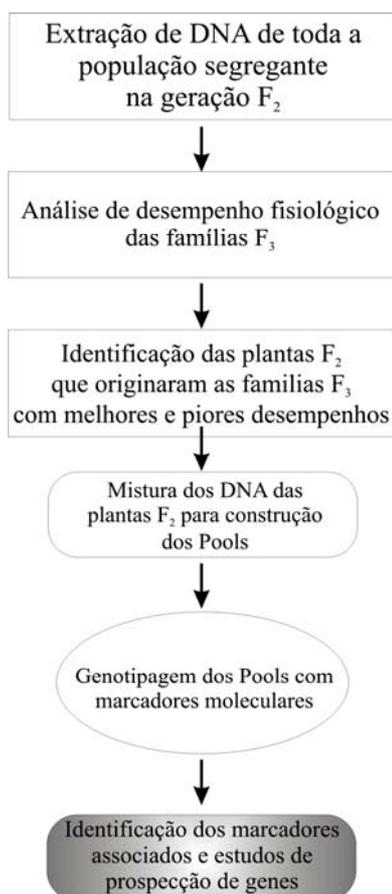
O delineamento experimental foi de blocos inteiramente ao acaso, com três repetições, com 154 famílias F<sub>3</sub>.

Em se tratando de um caráter destrutivo, a utilização do delineamento F<sub>2</sub> impede o avanço de gerações da população segregante, pelo que seria dificultoso determinar se as sementes F<sub>2</sub> que não germinaram foi por causa de que não apresentam o caráter ou por algum outro motivo associado ao desempenho fisiológico da semente. Essa limitação foi superada utilizando-se delineamentos F<sub>2:3</sub>, onde as plantas F<sub>2</sub> foram genotipadas com marcadores moleculares enquanto que o desempenho fisiológico associado ao genótipo F<sub>2</sub> individual foi estimado pelo valor médio das progênies F<sub>2:3</sub> (Lynch e Wash, 1998).

Desta maneira, a média das plantas emergidas, para cada família F<sub>3</sub> foi utilizada como parâmetro para identificação das plantas F<sub>2</sub> contendo maior acumulação de genes associados à germinação em grandes profundidades.

A análise de associação de marcadores foi realizada conjuntamente entre os laboratórios de Sementes e Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, RS e o Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisas em Arroz e Feijão, GO (CNPAF – Embrapa). Foi utilizado um total de 270 marcadores moleculares microssatélite específicos para arroz, sendo eles 50 disponibilizados pelo Laboratório de Sementes e Biotecnologia da UFPel e 220 pelo CNPAF – Embrapa.

As reações de amplificação (PCR) foram realizadas em termociclador PTC-100. Cinquenta ng de DNA genômico total foram combinados com 330 nM de cada primer microssatélite, 250 μM de cada dNTP e 0,6U de Taq DNA polimerase em volume final da reação de 15 μL. O seguinte programa de amplificação foi utilizado: (i) desnaturação inicial de 3 min a 94°C, (ii) 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 2 min, 72°C por 1,5 min, e (iii) extensão final a 72°C por 5 min. O produto da amplificação foi visualizado em géis de agarose 5% corados com brometo de etídeo para aqueles primers que apresentaram boa resolução de alelos. Para os primers nos quais a diferença de tamanho entre os alelos impossibilitava a análise mediante eletroforese em agarose, foi adotada a visualização em géis verticais de poliacrilamida 7%, corados com nitrato de prata (Briard *et al.*, 2000).



**FIGURA 4.2** – Diagrama ilustrativo dos passos envolvidos na identificação de marcadores moleculares associados com características de interesse mediante a metodologia *DNA Pooling*.

Os estudos de prospecção *in silico* foram realizados utilizando as seqüências genômicas correspondentes aos marcadores microssatélite associados à característica, obtidos no estudo de associação mediante *DNA Pooling*. A prospecção de genes foi realizada utilizando o programa FGENESH (disponível *on-line* no endereço <http://www.softberry.com/berry.phtml>). De posse dos genes prospectados, as proteínas por eles sintetizadas foram identificadas mediante análise de similaridade dentro do banco público de proteínas caracterizadas SWISS PROT (<http://www.expasy.org/sprot/>).

#### 4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 600 cruzamentos realizados foram obtidas 430 sementes  $F_1$  (Figura 4.3), das quais, 50% foram conservadas em câmara seca a 10°C e o restante utilizada para a obtenção de 215 plantas  $F_2$ . Destas, 154 originaram famílias  $F_{2;3}$ , que foram utilizadas para o teste fisiológico de germinação em grandes profundidades.

O resultado do desempenho fisiológico em grandes profundidades permitiu identificar 32 famílias  $F_3$  que apresentaram emergência em grandes profundidades (Tabela 4.1). O DNA de oito das 32 famílias  $F_3$  que apresentaram os melhores desempenhos no teste fisiológico, mensurado através da percentagem de emergência, foi misturado em quantidades equimolares para a realização da análise de *DNA Pooling* utilizando 270 marcadores microssatélite específicos para arroz (Panaud *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 1997, Temnykh *et al.*, 2000, Brondani *et al.*, 2001).



**FIGURA 4.3** - Detalhe das sementes  $F_1$  na panícula (A) e colhidas (B).

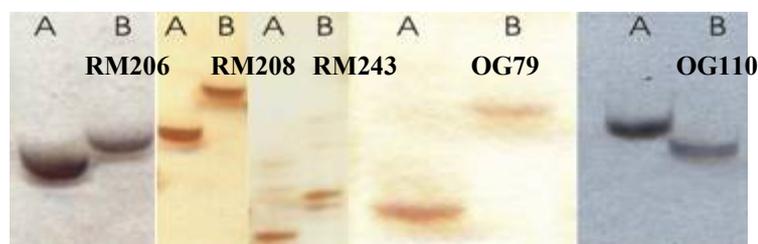
**TABELA 4.1** - Percentagem de germinação das 154 famílias F<sub>3</sub> utilizadas no teste de desempenho fisiológico de germinação/emergência em 15 cm de profundidade, UFPel, Pelotas, 2006.

Família	% Emergência	Família	% Emergência	Família	% Emergência
2	0,0	69	0,0	139	5,3
3	0,0	70	5,3	140	0,0
4	0,0	71	0,0	141	0,0
5	0,0	72	0,0	143	0,0
6	0,0	73	0,0	144	0,0
7	0,0	75	8,0	145	0,0
8	0,0	76	0,0	147	8,0
10	0,0	77	0,0	148	0,0
11	0,0	78	0,0	150	0,0
12	0,0	79	5,3	151	0,0
13	0,0	80	0,0	152	0,0
15	8,0	82	0,0	153	5,3
17	0,0	84	0,0	155	0,0
18	5,3	85	0,0	156	21,3
21	0,0	86	0,0	158	0,0
22	21,3	87	0,0	159	0,0
23	0,0	89	5,3	<b>160</b>	<b>29,3*</b>
24	0,0	90	0,0	161	0,0
26	0,0	91	0,0	162	0,0
28	0,0	<b>92</b>	<b>50,7*</b>	163	21,3
29	0,0	<b>94</b>	<b>29,3*</b>	165	0,0
30	0,0	95	0,0	166	0,0
31	0,0	96	0,0	167	0,0
32	0,0	97	0,0	168	0,0
<b>34</b>	<b>29,3*</b>	98	0,0	169	0,0
36	0,0	99	0,0	173	0,1
37	0,0	<b>101</b>	<b>40,0*</b>	175	0,0
38	21,3	102	0,0	176	0,0
39	0,1	105	13,3	177	0,0
40	0,0	107	0,0	178	0,0
41	0,0	109	0,0	179	0,0
42	8,0	111	13,3	182	0,0
43	0,0	112	0,0	183	0,0
44	13,3	114	0,0	184	0,0
46	0,0	<b>115</b>	<b>72,0*</b>	185	0,0
47	5,3	116	0,0	186	0,0
48	0,0	118	0,0	187	0,0
49	0,0	<b>120</b>	<b>42,7*</b>	188	0,0
50	0,0	122	0,0	189	0,0
53	0,0	123	0,0	190	8,0
54	0,0	124	0,0	191	0,0
56	0,0	125	0,0	192	0,0
57	2,7	126	0,0	194	0,0
59	0,0	127	0,0	195	0,0
60	0,0	128	0,0	196	0,0
62	0,0	129	0,0	197	13,3
63	0,0	130	0,0	198	0,0
64	0,0	132	0,0	199	0,0
65	0,0	134	0,0	200	0,0
66	0,0	135	0,0	201	0,0
<b>68</b>	<b>42,7*</b>	137	13,3		

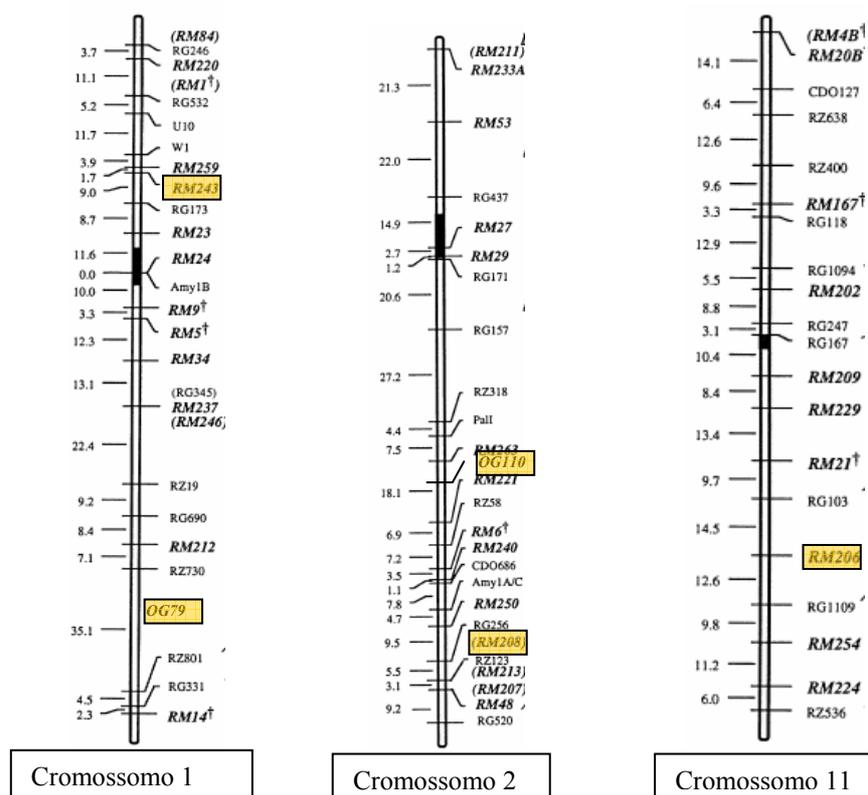
\*Famílias selecionadas para o teste de associação de marcadores moleculares mediante DNA Pooling.

A percentagem de emergência variou de zero a 72%, demonstrando claramente a natureza quantitativa da característica germinação/emergência em grandes profundidades, envolvendo a expressão de vários genes de pequeno efeito (QTLs). O

resultado da análise por *DNA Pooling* revelou cinco marcadores associados com a característica, sendo eles, os marcadores RM243 e OG79, localizados no cromossomo 1, os marcadores RM208 e OG110, localizados no cromossomo 2 e o marcador RM206, localizado no cromossomo 11 (Figuras 4.4 e 4.5).



**FIGURA 4.4** - Perfil molecular dos cinco marcadores moleculares associados à germinação/emergência de sementes em arroz. (A) Pool positivo (com o caráter); (B) Parental BRS 7 "Taim" (sem o caráter).



**FIGURA 4.5** - Localização cromossômica no mapa genético dos marcadores RM243, OG79, RM208, OG110 e RM206, associados com vigor de sementes em arroz. Baseado nos mapas genéticos de Chen *et al.*, (1997) e Brondani *et al.*, (2001).

As seqüências genômicas (contigs) correspondentes aos cromossomos onde os marcadores microssatélite RM206 (Clone Genebank N° AC146334.2, 170.681pb), RM208 (Clone Genebank N° AP004048, 145.014pb), RM243 (Clone Genebank N° AP003196, 144.141pb), OG79 (Clone Genebank N° AP003239.3, 151.085pb) e OG110 (Clone Genebank N° AP005286.3, 174.290pb) encontram-se localizados foram obtidas a partir da base de dados genômicos *on line* Gramene (<http://gramene.org>), e através de ferramentas de Bioinformática foram prospectados os genes circundantes as seqüências dos marcadores.

A prospecção de genes ligados aos cinco marcadores moleculares microssatélite permitiu identificar 14 proteínas associadas ao marcador RM 243, 21 ao marcador OG79, 18 ao marcador RM 208, 16 ao marcador OG110 e 14 ao marcador RM206 (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6).

**TABELA 4.2** - Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador RM206. UFPel/Pelotas, 2006.

<b>Marcador</b>	<b>Crom.</b>	<b>Clone Genebank</b>	<b>Identificação</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>Tam.</b>	<b>Função</b>
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1X3_ORYSA	NB-ARC domínio protéico	825 aa	Resposta de defesa contra patógenos
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1X1_ORYSA	NB-ARC domínio protéico	922 aa	Resposta de defesa contra patógenos
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1X0_ORYSA	NB-ARC domínio protéico	413 aa	Resposta de defesa contra patógenos
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1W8_ORYSA	Proteína hipotética	179 aa	Desconhecida
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1W7_ORYSA	Possível proteína retrotransposonica	1966 aa	União ao DNA, actividade ribonuclease H, união ao RNA,
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1W6_ORYSA	Possível proteína retrotransposonica	1030 aa	Desconhecida
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1W4_ORYSA	NB-ARC domínio protéico	920 aa	Resposta de defesa contra patógenos
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1W3_ORYSA	NB-ARC domínio protéico	967 aa	Resposta de defesa contra patógenos
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1W2_ORYSA	NB-ARC domínio protéico	916 aa	Resposta de defesa contra patógenos
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1W1_ORYSA	NB-ARC domínio protéico	964 aa	Resposta de defesa contra patógenos
RM 206	11	AC146334.2	GME2_ORYSA	GDP-manose 3,5-epimerase 2	371 aa	Cataliza a reação de epimerização de GDP-D manose na rota biosintética da vitamina C (L-ascorbato).
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1V7_ORYSA	Beta-ketoacyl-CoA sintase	494 aa	Actividade Acyltransferase
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1V5_ORYSA	Protease intracelular	396 aa	Actividade Peptidase
RM 206	11	AC146334.2	Q2R1V3_ORYSA	WIN2 – proteína inducida por injuria	158 aa	Desconhecida

**TABELA 4.3** - Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador RM208. UFPel/Pelotas, 2006.

<b>Marcador</b>	<b>Crom.</b>	<b>Clone Genebank</b>	<b>Identificação</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>Tam.</b>	<b>Função</b>
RM 208	2	AP004048	Q9LL45_ORYSA	Proteína de união ao telomero	633 aa	União ao DNA, modificação protéica, regulação da transcrição.
RM 208	2	AP004048	Q6K9S2_ORYSA	Possível proteína de resistência ao gafanhoto marrom	212 aa	Desconhecida
RM 208	2	AP004048	Q336V3_ORYSA	Possível monooxigenase citocromo P450	588 aa	União ao ferro, união a metais, atividade monooxigenase, transporte de elétrons.
RM 208	2	AP004048	Q9SSY0_ORYSA	Proteína Pi-b	978 aa	Desconhecida
RM 208	2	AP004048	Q6K9R7_ORYSA	DNA ligase	304 aa	Atividade ligase
RM 208	2	AP004048	Q6K9R6_ORYSA	Proteína de união ao Selênio	740 aa	União
RM 208	2	AP004048	Q6K9R4_ORYSA	Proteína associada a metais pesados.	356 aa	União a metais
RM 208	2	AP004048	Q6K9R3_ORYSA	Proteína dedos de zinco	239 aa	União ao zinco
RM 208	2	AP004048	Q6K9R2_ORYSA	Possível Thioredoxina H	174 aa	Atividade de transporte de elétrons
RM 208	2	AP004048	Q6K9R1_ORYSA	Pumilio	1001 aa	União ao RNA
RM 208	2	AP004048	Q6K721_ORYSA	OTU-cisteine protease	286 aa	Atividade peptidase
RM 208	2	AP004048	Q6K720_ORYSA	Possível proteína P0474F11.3	450 aa	União ao ATP, proteína serine/treonine kinase, atividade transferase, fosforilação de aminoácidos.
RM 208	2	AP004048	Q6K719_ORYSA	Proteína dedos de zinco	188 aa	União ao zinco
RM 208	2	AP004048	Q6K718_ORYSA	Proteína kinase	424 aa	União ao ATP, proteína serine/treonine kinase, atividade transferase, fosforilação de aminoácidos.
RM 208	2	AP004048	Q94F84_ORYSA	Proteína fosfatase	344 aa	Atividade hidrolase, união ao ferro.
RM 208	2	AP004048	Q6K716_ORYSA	Proteína dedos de zinco	411 aa	União a metais, união ao zinco.
RM 208	2	AP004048	Q6K715_ORYSA	Proteína kinesine	621 aa	União
RM 208	2	AP004048	Q6K714_ORYSA	Possível antocianina aciltransferase	453 aa	Atividade transferase e aciltransferase

**TABELA 4.4** - Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador RM243. UFPel/Pelotas, 2006.

<b>Marcador</b>	<b>Crom.</b>	<b>Clone Genebank</b>	<b>Identificação</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>Tam.</b>	<b>Função</b>
RM 243	1	AP003196	Q8H5F1_ORYSA	Proteína BHLH	217 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q53MA7_ORYSA	Glucan endo-1,3-beta-glucanase	115 aa	Atividade hidrolase, hidrolizando enlaces O-glicosil, metabolismo de carboidratos.
RM 243	1	AP003196	Q2QM30_ORYSA	Possível proteína	378 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q5NAA7_ORYSA	Possível proteína B1008C01.13	508 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q7XTI5_ORYSA	Proteína OSJNBa0020P07.19	692 aa	União ao DNA, dimerização de proteínas.
RM 243	1	AP003196	Q5NAA4_ORYSA	Proteína helicase	2498 aa	Atividade helicase, atividade triose-fosfato isomerase.
RM 243	1	AP003196	Q5NAA2_ORYSA	Possível proteína B1008C01.21	388 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q8LRG0_ORYSA	Possível proteína B1008C01.22	311 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q60D97_ORYSA	Possível poli-proteína	971 aa	União ao DNA, dimerização de proteínas.
RM 243	1	AP003196	Q5NA98_ORYSA	Possível proteína B1008C01.27	577 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q5NA94_ORYSA	Possível proteína B1008C01.31	378 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q852B1_ORYSA	Possível proteína OSJNBb0081B07.14	402 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q2QPW6_ORYSA	Possível proteína transposonica CACTA	284 aa	Desconhecida
RM 243	1	AP003196	Q9ARR7_ORYSA	Possível proteína OSJNBa0004G10.10	269 aa	Desconhecida

**TABELA 4.5** - Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador OG79. UFPel/Pelotas, 2006.

<b>Marcador</b>	<b>Crom.</b>	<b>Clone Genebank</b>	<b>Identificação</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>Tam.</b>	<b>Função</b>
OG79	1	AP003239.3	Q94DY2_ORYSA	Proteína zipper de leucina	601 aa	Exocitose
OG79	1	AP003239.4	Q10NJ9_ORYSA	Proteína lipase	584 aa	Desconhecida
OG79	1	AP003239.5	GSTH2_ORYSA	S-transferase GSTF2	215 aa	Induzida por herbicida safener fenclorim e estresse por droga.
OG79	1	AP003239.6	Q94DX8_ORYSA	Possível proteína P0403C05.6	118 aa	Desconhecida
OG79	1	AP003239.7	Q5JN20_ORYSA	Possível proteína P0403C05.7	382 aa	Desconhecida
OG79	1	AP003239.8	Q5JN19_ORYSA	Possível chorismate mutase	313 aa	Atividade chorismate mutase, biossíntese de aminoácidos aromáticos.
OG79	1	AP003239.9	Q6YYJ6_ORYSA	Possível proteína OJ1590_E05.35-1	580 aa	União ao DNA, atividade nuclease, mecanismos de reparação do DNA, recombinação de DNA, resposta SOS.
OG79	1	AP003239.10	Q5JN10_ORYSA	Possível proteína P0403C05.12-1	372 aa	Atividade kinase, transferase, biossíntese de aminoácidos.
OG79	1	AP003239.11	Q5JN17	Possível proteína P0403C05.13	180 aa	Atividade nuclease, mecanismos de reparação do DNA, recombinação de DNA, metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucleicos.
OG79	1	AP003239.12	Q75GC0_ORYSA	Possível poli-proteína	1480aa	União ao DNA, atividade ribonuclease H, união ao RNA, atividade DNA polimerase, replicação do DNA.
OG79	1	AP003239.13	Q7XUY8_ORYSA	Proteína OSJNBa0033G16.7	107 aa	Desconhecida
OG79	1	AP003239.14	GH32_ORYSA	Proteína de resposta a Auxin-GH3	614 aa	Síntese de indol-3-ácido acético (IAA) - aminoácidos conjugados, amino acid conjugates, provendo um mecanismo para controle do excesso de auxina. Expressa em raízes e flores.
OG79	1	AP003239.15	Q94DX0_ORYSA	Proteína pentatricopeptide	482 aa	União
OG79	1	AP003239.16	Q5JN09_ORYSA	Deoxicitidilate deaminase	184 aa	Atividade hidrolase, união ao zinco.
OG79	1	AP003239.17	Q5JN15_ORYSA	Componente do sistema ubiquitina	1111aa	União a nucleotídeos, união ao RNA.
OG79	1	AP003239.18	Q94DW6_ORYSA	Proteína serpin	411 aa	Endopeptidase serina
OG79	1	AP003239.19	Q9ARY7_ORYSA	Subunidade de receptor GABA-A	708 aa	Receptor
OG79	1	AP003239.20	Q94DW4_ORYSA	Proteína calmodulina	220 aa	União a íons de cálcio.
OG79	1	AP003239.21	Q5JN07_ORYSA	Proteína dedos de zinco	355 aa	União ao DNA, união ao zinco.
OG79	1	AP003239.22	Q5JN06_ORYSA	Proteína integral de membrana	484 aa	Atividade antiporter, atividade de transporte de drogas.
OG99	1	AP003239.23	Q5ZAN7_ORYSA	Possível proteína dedos de RING	224 aa	União a íons metálicos, união ao zinco.

**TABELA 4.6** - Genes, proteínas e suas respectivas funções biológicas, prospectadas na região cromossômica do marcador OG110. UFPel/Pelotas, 2006.

<b>Marcador</b>	<b>Crom.</b>	<b>Clone Genebank</b>	<b>Identificação</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>Tam.</b>	<b>Função</b>
OG110	2	AP005286.3	Q69XM6_ORYSA	Possível proteína citocromo P-450	147 aa	União ao ferro, atividade monooxigenase, transporte de elétrons.
OG110	2	AP005286.4	Q33BK8_ORYSA	Retrotransposon	1831 aa	União ao DNA, união ao zinco.
OG110	2	AP005286.5	Q6K9B8_ORYSA	S-adenosilmetionine descarboxilase	554 aa	Atividade adenosilmetionine descarboxilase, biossíntese de espermidine.
OG110	2	AP005286.6	Q69JB4_ORYSA	Possível proteína SET 110	230 aa	Desconhecida
OG110	2	AP005286.7	Q6K643_ORYSA	Possível pentatricopeptide protein	697 aa	União
OG110	2	AP005286.8	Q6K642_ORYSA	Possível proteína	119 aa	Desconhecida
OG110	2	AP005286.9	Q6K641_ORYSA	Possível fator de iniciação eucariótico (Iso)4, subunidade F	780 aa	União ao RNA, atividade de fator de iniciação da tradução.
OG110	2	AP005286.10	Q6K638_ORYSA	Possível hidroxiantranilate hidroycinnamoiltransferase 3	463 aa	Atividade transferase.
OG110	2	AP005286.11	Q53PH7_ORYSA	Retrotransposon	339 aa	União ao RNA, DNA polimerase, replicação de DNA dependente de RNA.
OG110	2	AP005286.12	Q6K635_ORYSA	Possível co-chaperona CGE1	355 aa	Fator de intercambio adenilnucleotide, união a chaperonas, união a proteínas não plegadas, plegado de proteínas.
OG110	2	AP005286.13	Q6K634_ORYSA	Possível proteína OJ1004_A05.21	168 aa	Atividade N-metiltransferase, metabolismo de fosfolípidos.
OG110	2	AP005286.14	Q6K625_ORYZA	Proteína de tetramerização de canais de potássio.	458 aa	Atividade de canal iônico, união a proteínas, canais de potássio regulados por voltagem, transporte iônico.
OG110	2	AP005286.15	Q6K624_ORYSA	Proteína BRI1-KD 135	759 aa	Desconhecida
OG110	2	AP005286.16	Q6K623_ORYSA	Possível proteína induzida por estresse de temperatura	195 aa	União a lípidos.
OG110	2	AP005286.17	Q7XQX1_ORYSA	Proteína OSJNBa0014K14.4	473 aa	União a ions cálcio.
OG110	2	AP005286.18	Q6K621_ORYSA	Proteína exostosine	482 aa	Desconhecida

Dos 83 genes prospectados, apenas alguns deverão estar efetivamente envolvidos na expressão do caráter germinação/emergência em grandes profundidades do solo. Isto pode ser devido a que a análise e identificação de marcadores associados a genes de efeito quantitativo (QTLs) em populações segregantes deve ser analisada com algumas ressalvas. A principal delas é a forte interação entre o QTL e o ambiente, o que faz com que sejam necessárias reavaliações a campo para que o efeito do ambiente seja minimizado e assim, aumentar as chances de identificar os efeitos dos genes de pequeno efeito, principalmente em gerações iniciais. Este procedimento aumenta consideravelmente as chances de identificar marcadores próximos aos genes.

Deve ser considerado ainda que a seqüência genômica utilizada para a prospecção de genes correspondente a cada marcador (em média 150.000pb ao redor da seqüência do marcador microssatélite), é varias vezes maior do que o tamanho real do fragmento genômico amplificado pelo marcador (aproximadamente entre 400 e 1000pb). Isto pode ter ocasionado à prospecção de muitos genes constitutivos que são comuns a ambos os genitores, que não apresentam nenhuma segregação. Conseqüentemente, não estão relacionados com a expressão fenotípica do caráter (Figura 4.6).



**FIGURA 4.6.** Imagem parcial do banco de dados GRAMENE, onde pode ser observada a localização cromossômica do marcador RM206 (A – Linha vermelha) e ampliação da região genômica ilustrando os clones genômicos e a localização específica do marcador RM206 (B – Linha vermelha).

Outros fatores podem influenciar na detecção de marcadores ligados a QTLs, como o número de genes envolvidos na expressão do caráter, a existência de interações gênicas, a herdabilidade do caráter, o número de genes segregando na população, o tipo e tamanho da população segregante e o número de marcadores utilizados.

No entanto, dois dos marcadores microssatélite identificados como associados ao caráter germinação/emergência, revelaram ligação com genes de conhecido efeito direto sobre o processo de germinação das sementes. Por um lado, o marcador RM206, localizado no cromossomo 11, mostrou-se ligado a sete genes de resistência a patógenos (Tabela 4.2).

Segundo Chen *et al.* (1997), o marcador RM206 foi identificado como ligado ao gene *Pi5*, que confere resistência a *Magnaporthe grisea*, fungo responsável pela doença conhecida como Brusone no arroz. Esta doença fungica, transmitida por sementes é responsável por perdas que atingem até 100% quando as condições são favoráveis à multiplicação do fungo. É amplamente sabido que os genes de resistência constituem blocos de ligação com escassa segregação. Isto poderia ser uma possível explicação para a presença de tantos genes de resistência concentrados numa mesma região genômica. Segundo Lucca Filho (2006), são inúmeros os relatos que citam os efeitos do ataque de patógenos das sementes sobre a qualidade fisiológica. Como consequência direta do ataque de patógenos, teremos reduções da porcentagem de germinação e do vigor, com reflexos altamente negativos no desempenho destas sementes no campo. Por isso, estudos mais aprofundados sobre os efeitos do ataque de patógenos às sementes na população segregante utilizada neste estudo poderão ser de extrema utilidade para confirmar de que um dos fatores associados aos problemas de germinação e vigor nas sementes de arroz é relacionada com a resistência ao ataque de patógenos presentes nas sementes e no solo.

Outro marcador que se revelou estar ligado a um gene de extrema importância no processo germinativo das sementes é o marcador RM243, localizado no cromossomo 1 (Tabela 4.4). Este marcador co-segregou com o gene que codifica para a proteína Glucano endo-1,3  $\beta$ -glicosidase, uma  $\beta$ -amilase que atua junto com as  $\alpha$ -amilase na hidrólise dos enlaces O-glicosídicos durante o metabolismo dos carboidratos do endosperma no processo de germinação.

Realizando estudos de clonagem e expressão diferencial de enzimas hidrolíticas em arroz, Akiyama *et al.* (2004) identificaram o gene OsGLN2, que codifica para uma endo-1,3  $\beta$ -glicosidase, com elevados índices de expressão nas fases de florescimento e germinação das sementes. Nenhum indício de expressão desta proteína foi detectado em qualquer outro tecido da planta. A proteína OsGLN2 foi 72% similar à proteína GII da cevada e 93% similar com outra glucanase caracterizada do arroz, a proteína Gns4. Durante o florescimento, a proteína OsGLN2 é expressa exclusivamente na palea e lema das sementes, enquanto que durante a germinação das sementes a sua expressão foi predominante em tecidos endospermáticos e não embrionários. Por outro lado, os mesmos autores identificaram que a expressão do gene OsGLN2 é aumentada pelo efeito *in vitro* da Giberelina ( $GA_3$ ), enquanto que a adição de Acido Abscisico (ABA) interrompe o processo. Isto faz sentido, considerando que o processo de germinação das sementes, e os genes que atuam neste processo, são fortemente influenciados pela ação de fitohormônios, tais como  $GA_3$  e ABA. Isto aumenta ainda mais as chances de que o gene que codifica para a proteína Glucano endo-1,3  $\beta$ -glicosidase, ligado ao marcador RM243, esteja, efetivamente, envolvida na expressão do vigor nas sementes, aumentando consideravelmente as chances de germinação/emergência quando submetidas a grandes profundidades de semeadura.

O fato de a análise de QTLs não identificar necessariamente um gene, mas uma região genômica que pode conter diversos outros genes, incluindo os desfavoráveis para uma determinada característica, faz com que os resultados forneçam apenas uma aproximação das regiões que a controlam. Estudos posteriores visando à identificação dos principais genes e o ambiente específico onde estes são expressos se faz necessários. Isto pode ser realizado mediante a saturação da região do mapa genético nas regiões onde se encontram localizados os cinco marcadores identificados neste estudo. Marcadores do tipo RAPD ou AFLP, de grande poder multiplex, podem ser de extrema utilidade na identificação de marcadores estreitamente ligados com o caráter. Marcadores distanciados em até 5 cM do gene conferem ampla confiabilidade para sua utilização em programas de seleção assistida por marcadores moleculares.

#### **4.6. CONCLUSÕES**

- O processo germinativo das sementes de arroz a grandes profundidades no solo revela a ação de vários genes de efeito quantitativo;
- Foi possível identificar marcadores do tipo microssatélites associados à pelo menos dois possíveis QTLs atuando no processo de germinação/emergência das sementes de arroz.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

O caráter germinação/emergência em grandes profundidades envolve a interação e expressão de vários genes em número e tipos desconhecidos. Entre eles, os genes da  $\alpha$ -amilase parecem estar diretamente envolvidos, sendo que mutações no gene  $\alpha$ -amilase AMY1 do arroz foram correlacionados com um decréscimo no desempenho fisiológico das sementes. Neste trabalho foi possível também, evidenciar um comportamento claramente quantitativo do caráter germinação/emergência. Os estudos moleculares realizados permitiram identificar cinco marcadores microssatélite associados ao caráter. Destes, dois mostraram-se estreitamente ligados a genes de fundamental importância no processo germinativo das sementes. Por um lado, o marcador RM 206 revelou associação com genes de resistência a patógenos, enquanto que o marcador RM 243 esteve ligado a um gene  $\beta$ -amilase, responsável pela degradação das reservas do embrião durante o processo de germinação.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, H., YOKOZEKI Y., INAGAKI A., & FUJIMURA T. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theor. Appl. Genet.** v.94, p.61–67. 1997.

AKIYAMA T, PILLAI MA, SENTOKU N. Cloning, characterization and expression of OsGLN2, a rice endo-1,3-beta-glucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds. **Planta.** v.220, n.1, p.129-39. 2004.

ALFENAS, A. C. **Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1998. 574p.

ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. O afilhamento da aveia afetado pela qualidade da luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n.3, p. 393-400, 2001.

ANDERSON, J.A., CHURCHILL G.A., AUTRIQUE J.E., TANKSLEY S.D., & SORRELLS M.E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome** v.36, p.181–186. 1993.

AUGUSTIN, E.; FRANCO F.; TERRES A. Detecção de mistura varietal, e caracterização de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) através de padrões isoenzimáticos. En: **XXII Reunião da Cultura do Arroz irrigado**, Anais. Balneário Camboriu. EPAGRI-IRGA-EMBRAPA/CPACT.p. 84-86. 1997.

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

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

BONOW, S., AUGUSTIN, E.D., FRANCO, F., PETERS, J. A. & TERRES DA S, A. L. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.36, n.2, p.291-300. 2001.

BOTSTEIN, D., R.L. WHITE, M. SKOLNICK, & R.W. DAVIS. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **Am. J. Hum. Genet.** 32: 314–331. 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRIARD, M., CLERA, V.LE, GNZEBELUS, D. et al. Modified Protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver stain on radioisotopes. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.18, p.235–241, 2000.

BRONDANI, C; VIANELLO BRONDANI, R. P; RANGEL, P. H. N and FERREIRA, M. E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*–derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas** 134: 59-71 2001.

CHEN, X., S. TEMNYKH, Y. XU, Y.G. CHO, & S.R. MCCOUCH. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 95:553–567. 1997.

CHO, Y.G., BLAIR, M. W., PANAUD, O., & MCCOUCH, S. R. Cloning and mapping of variety specific rice genomic DNA sequences amplified length fragment polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. **Genome** v.39, p.373-378. 1995.

COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. **Broadening the genetic base of crops: an overview.** In: COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. (Ed.). Broadening the genetic base of crop production. Wallingford: CABI, 2001. p. 1-23.

CUI, K.H, PENG, S.B, XING, Y.Z, XU, C.G, YU, S.B AND ZHANG, Q. Molecular dissection of seedling vigor and associated physiological traits in rice. **Theoretical and Applied Genetics.** v.105, p.745-753. 2002.

DAUSSANT, J., MIYATA, S., MITSUI, T. AND AKAZAWA, T. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds (15): immunochemical study on multiple forms of amylase. **Plant Physiol.** v.71, p. 88-95. 1983.

DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, Hampshire, v. 3, n. 1, p. 22-32, Jan. 2002.

DELOUCHE, J. C. Melhorias no sistema da semente. **SEED News**, ano x, n. 5, p. 40-41, 2006.

ENDO, T., MORISHIMA, H. Rice. In: TANKSLEY, S. D.; ORTTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding.** Amsterdam : Elsevier, 1983. part B, p. 129-146.

FALCONER, D. S. **Introdução a genética quantitativa.** Viçosa: UFV, 1987. 279 p.

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

GEALY, D., TAI, T., SNELLER, C. Identification of red rice, rice and hybrid populations using microsatellite markers. **Weed Science.** v.50, p.333-339. 2002.

GUEX, N. AND PEITSCH, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis** v.18, p.2714-2723. 1997.

GUIDOLIN, A. F. **Caracterização de genótipos de arroz irrigado por técnicas eletroforéticas.** Programa de Pós-graduação em Ciencia e Tecnologia de Sementes,

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas: UFPel, 1993. 92p. Dissertação de Mestrado.

HENDERSON, S. T., & PETES, T. D.. Inestability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** v.12, p.2749-2757. 1992.

HIGGINS, H.G; THOMPSON, J.D. AND GIBSON, T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. **Methods Enzymol**, v.266, p.383-402, 1996.

HUANG N, STEBBINS GL, RODRIGUEZ RL. Classification and evolution of  $\alpha$ -amylase genes in plants. **Proc Natl Acad Sci USA** v.89, p.7526–7530. 1992.

HUANG, N., KOIZUMI, N., REINL, S. AND RODRIGUEZ, R.L. Structural organization and differential expression of rice  $\alpha$ -amylase genes. **Nucl. Acids Res.** v.18, p.7007-701. 1990a.

HUANG, N., SUTLIFF, T., LITTS, J.C. AND RODRIGUEZ, R.L. Classification and characterization of the rice  $\alpha$ -amylase multigene family. **Plant Mol. Biol.** v.14, p.655-668. 1990b.

JACKSON, M.T., & JUGGAN, R. Sharing the diversity of rice to feed the world. **Diversity** v.9, p.22–25. 1993.

JONES RL, JACOBSEN JV. Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. **Int Rev Cytol** v.126, p.49–88. 1991.

KADZIOLA, A., ABE, J., SVENSSON, B. AND HASER, R. Crystal and molecular structure of barley  $\alpha$ -amylase. **J. Mol. Biol.**, v.239, p.104-121. 1994.

KANAMORI, T., KONISHI, S.& TANAKA, E.. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the média. **Physiol. Plant.** v.26, p.1-6. 1972.

KNOX, C., SONTHEYANON, B., CHANDRA, G.R., MUTHUKRISHNAN, S. Structure and organization of two divergent  $\alpha$ -amylase genes from barley. **Plant Mol Biol** v.9, p.3–17. 1987.

KRYZANOWSKY, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. ABRATES: Londrina, 1999. 218p.

LANGEVIN, S., CLAY, K., GRACE J. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). **Evolution** v.44, n.4, p.1000-1008. 1990.

LIZHI, G., SONG, G., DEYUAN, H., RUSHUN, L., GUODA, T. & ZAIFU, X. Allozyme variation and conservation genetics of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Yunnan, China. **Euphytica** v.124, p.273–281. 2002.

LUCCA FILHO, O. Patologia de Sementes. In: PESKE, S. T; LUCCA FILHO, O & BARROS, A. C. S. A. **Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos** (2da edição revisada). Pelotas. Editora e Gráfica Universitária (UFPel), 2006. p 225-280.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980p.

MACKILL, D.J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Sci.** v.35., p.889–894. 1995.

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

MALONE, G. & P. D. ZIMMER. Marcadores Moleculares. In: ZIMMER, P. D., OLIVEIRA, A. C., & MALONE, G. **Ferramentas da Biotecnologia no Melhoramento Genético Vegetal**. Pelotas. Editora e Gráfica Universitária (UFPel), 2005. p 77-113.

MALONE, G; ZIMMER, P. D; CASTRO, A. da S; ARIAS, L. N; MENEGHELLO, G. E; PESKE, S. T. Caracterização bioquímica e molecular de ecótipos de arroz vermelho coletados no estado de Rio Grande do Sul. **Pesquisa agropecuária tropical**, v.37, n.2. p. 77-85. 2007.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers to disease-resistance genes by bulked segregant analyses: a rapid method detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V.88, p.9828-9832, 1991.

NEI, M. & LI, W. H.. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings National Academic Sciences**, v.76, p.5269–5273. 1979.

NI, J., COLOWIT, P. M. & MACKILL, D. J.. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. **Crop Sci**. v.42, p.601–607. 2002.

OLUFOWOTE, J.O., XU, X., CHEN, W.D., PARK, H.M., BEACHELL, R.H. DILDAY, M., GOTO, M & MCCOUCH, S.R. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. **Genome** v.40, p.370–378. 1997.

PANAUD O; CHEN, X; MCCOUCH, S. R. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome** v.38, p.1170. 1995.

PERRETO, E. **Avaliação das sementes, plântulas e plantas de arroz daninho**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciencia e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1990. 72p.

RAMIREZ, H.; CALDERON, A. & ROCCA, W.. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. En: W. Rocca, L. Mroginski. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones**. Cali. 1991. p. 825-856.

RANJHAN, S., LITTS, J.C., FOOLAD, M.R. AND RODRIGUEZ, R.L. Chromosomal localization and genomic organization of alpha-amylase genes in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoret. Appl. Genet**. v.82, p.481-488. 1991.

REDOÑA, E.D., and MACKILL, D.J. Mapping quantitative trait loci for seedling vigour in rice using RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics** v.92, p.395-402. 1996.

ROGERS J.C. Two barley  $\alpha$ -amylase gene families are regulated differently in aleurone cells. **J Biol Sci** v.260, p.3731–3738. 1985.

ROGERS J.C, MILLIMAN C. Coordinate increase in major transcripts from the high pI  $\alpha$ -amylase multigene family in barley aleurone cells stimulate with gibberellic acid. **J Biol Chem** v.259, p.12234–12240. 1984.

ROLHF, F.J. NTSYS-pc: **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1 Exeter Publications, New York, USA, 2000.

RONDENBURG KW, VALLE' E F, JUGE N, AGHAJARI N, GUE X, HASER R, SVENSSON B. Specific inhibition of barley  $\alpha$ -amylase 2 by barley  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor depends on charge interactions and can be conferred to isozyme 1 by mutation. **Eur J Biochem** v.267, p.1019–1029. 2000.

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

SASAKI, Takuji; WU, Jianzhong; KANAMORI, Hiroyuki; KATAYOSE, Yuichi; FUJISAWA, Masaki; NAMIKI, Nobukazu; MIZUNO, Hiroshi; YAMAMOTO, Kimiko; ANTONIO, Baltazar A.; BABA, Tomoya; SAKATA, Katsumi; NAGAMURA, Yoshiaki; AOKI, Hiroyoshi; ARIKAWA, Koji; ARITA, Kohei; BITO, Takahito; CHIDEN, Yoshino; FUJITSUKA, Nahoko; FUKUNAKA, Rie; YUAN, Qiaoping; OUYANG, Shu; LIU, Jia; JONES, Kristine M.; GANSBERGER, Kristen; MOFFAT, Kelly; HILL, Jessica; BERA, Jayati; FADROSH, Douglas; JIN, Shaohua; JOHRI, Shivani; KIM, Mary; OVERTON, Larry; REARDON, Matthew; TSITRIN, Tamara; VUONG, Hue; WEAVER, Bruce; CIECKO, Anne; TALLON, Luke; JACKSON, Jacqueline; YING, Kai; LI, Ying; LU, Tingting; HUAGHUE, Yuchen; ZHAO, Qiang; FENG, Qi; ZHANG, Lei; ZHU, Jingjie; WENG, Qijun; MU, Jie; LU, Yiqi; FAN, Danlin; LIU, Yilei; GUAN, Jianping; YU, Shuliang; LIU, Xiaohui; YU, Yeisoo; KIM, Hye Ran; RAMBO, Teri; COLLURA, Kristi; LUO, Meizhong; YANG, Tae-jin; AMMIRAJU, Jetty S. S.; ENGLER, Friedrich; PALMER, Lance E.;

BASTIDE, Melissa de La; SPIEGEL, Lori; NASCIMENTO, Lidia; O'SHAUGHNESSY, Andrew; DIKE, Sujit; DEDHIA, Neilay; PRESTON, Raymond; BALIJA, Vivekanand; MCCOMBIE, W. Richard; CHOW, Teh-yuan; CHEN, Hong-hwa; CHUNG, Mei-chu; SHAW, Jei-fu; LIN, Yao-cheng; LIOU, John-yu; LIU, Shu-mei; HSING, Yue-ie; RAGHUVANSHI, S.; MOHANTY, A.; TYAGI, A. K.; GAIKWAD, K.; SINGH, A.; PAL, A. K.; GHAZI, I. A.; PANDIT, A.; BHARGAVA, A.; MESSING, Joachim; NELSON, Amy Bronzino; FUKS, Galina; KAVCHOK, Steve; KEIZER, Gladys; LLACA, Eric Linton Victor; SONG, Rentao; TANYOLAC, Bahattin; HAHN, Jang Ho; SANGSAKOO, G.; VANA VICHIT, A.; MATTOS, Luiz Anderson Teixeira de; MALONE, Gaspar; DELLAGOSTIN, Odir; ZIMMER, Paulo Dejalma; OLIVEIRA, Antonio Costa de; BEVAN, Michael; BANCROFT, Ian; MINX, Pat; CORDUM, Holly; WILSON, Richard; CHENG, Zhukuan; JIANG, Jiming; LEONG, Sally Ann. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 793-800, 2005.

SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, Austin, v.3, p.37-39, 1969.

SGUAREZI, C. N. **O arroz daninho (*Oryza sativa* L.) como fonte de variabilidade genética para o entendimento da germinação/emergência no arroz cultivado**. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004. 65p.

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

SUH, H.S.; SATO, Y. L. & MORISHIMA, H. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. **Theoretical Applied Genetics** v.94, p.316-321. 1997.

SUTLIFF, T.D., HUANG, N., LITTS, J.C. AND RODRIGUEZ, R.L. Characterization of an alpha-amylase multigene cluster in rice. **Plant Mol. Biol.** v.16, p.579-591. 1991.

TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**, Washington, v. 277, n. 5329, p. 1063-1066, 1997.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** v.17, p.6463–6471. 1989.

TEMNYKH, S., PARK, W.D., AYRES, N., CARTINHO, S., HAUCK, N., LIPOVICH, L., CHO, Y.G., ISHII, T. & MCCOUCH S.R. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** v.100, p.697–712. 2000.

VIRK, P.S., FORD-LLOYD, B.V., JACKSON, M.T. & NEWBURY, H.J. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. **Heredity** v.74, p.170–179. 1995.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE T., HORNES, M., FRITJERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** v.23, p.4407–4414. 1995.

WHITTIER RF, DEAN AD, ROGERS JC. Nucleotide sequence analysis of alpha-amylase and thiol protease genes that are hormonally regulated in barley aleurone cells. **Nucleic Acids Res** v.15, p.2514–2535. 1987.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V.. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** v.18, p.6531–6535. 1990.

WU, K.S., & TANKSLEY, S.D.. Genetic and physical mapping of telomers and macrosatellites of rice. **Plant Mol. Biol.** v.22, p.861–872. 1993.

WU, X. M., CHEN C. B. & LI D. Y. Esterase isozymes in the wild rices of Guangxi. Disponível: National Agriculture Library Disponível em:<[http://www.gramene.org/newsletters/rice\\_genetics/rgn3/v3I10.html](http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn3/v3I10.html)>. Acesso em: 7 mar. 2005.

YAMAMOTO T (ed) **Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes**. The Amylase Research Society of Japan. CRC, Boca Raton. 1995

YANG, G.P., MAROOF, M.A.S., XU, C.G., ZHANG, Q. & BIYASHEV, R.M.. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Mol. Gen. Genet.** v.245, p.187–194. 1994.

ZHANG ZH, YU S-B, YU T, HUANG Z AND ZHU YG. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) for seedling vigor using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Field Crops Research** v.91, p.161-170. 2005.

ZWICKERT-MENTEUR S, JESTIN L, BRANLARD G. Amy2 polymorphism as a possible marker of b-glucanase activity in barley (*Hordeum vulgare* L.). **J Cereal Sci** v.24, p.55–63. 1996.