

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TESE

**Qualidade de grãos, tolerância ao estresse por ferro e
variabilidade genética em arroz**

Naciele Marini

Pelotas, 2012

NACIELE MARINI

**Qualidade de grãos, tolerância ao estresse por ferro e
variabilidade genética em arroz**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Luciano Carlos da Maia, Dr.

Co-orientadores: Adriana Pires Soares Bresolin, Dr^a.

Antônio Costa de Oliveira, PhD.

Pelotas, 2012.

Dados de catalogação na fonte:
(Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB10/1032)

M339q

Marini, Naciele

Qualidade de grãos, tolerância ao estresse por ferro e variabilidade genética em arroz / Naciele Marini. – 126 f.– Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, 2012. – Orientador Luciano Carlos da Maia; co-orientador Adriana Pires Soares Bresolin e Antônio Costa de Oliveira.

1. *Oryza Sativa*. 2. Expressão gênica. 3. Amilose. 4. Estresse abiótico. I. Maia, Luciano Carlos da. II. Bresolin, Adriana Pires Soares. III. Oliveira, Antônio Costa de. IV. Título.

CDD: 633.18

Banca examinadora:

Luciano Carlos da Maia, Dr. – FAEM/UFPeI - ORIENTADOR (PRESIDENTE)

Antônio Costa de Oliveira, Ph.D. – FAEM/UFPeI – CO-ORIENTADOR

Ariano Martins de Magalhães Jr. Dr. – Embrapa Clima Temperado/CPACT

Luiz Anderson Teixeira de Mattos, Dr. – RiceTec Sementes Ltda

Rosa Lia Barbieri, Dr. – Embrapa Clima Temperado/CPACT

Ao meu filho João Pedro

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço pelo dom da vida, pela saúde, luz e perseverança necessárias para superar os pensamentos negativos e barreiras impostas pela vida, permitindo-me seguir em frente rumo à conquista de mais uma etapa!

Ao professor Antonio Costa de Oliveira, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe e pela contribuição decisiva na minha formação. Além disso, pelos conhecimentos transmitidos, confiança e amizade construída ao longo destes sete anos de convivência.

Ao meu orientador, professor Luciano Carlos da Maia, pelos “puxões” de orelha quando necessários, os quais me incentivaram na superação dos desafios, pelos ensinamentos e pela amizade.

A minha co-orientadora e acima de tudo amiga professora Adriana Pires Soares Bresolin, pelo convívio, experiências transmitidas e amizade, indicando sempre o melhor caminho a ser traçado.

Aos pesquisadores da Embrapa Clima Temperado, Ariano Martins de Magalhães Jr. e Rosa Lia Barbieri, pela disponibilidade, auxílio e conhecimentos transmitidos, em todos os momentos em que precisei.

Ao departamento de Solos, especialmente aos colaboradores Professor Rogério Oliveira de Sousa e Roberto Carlos Doring Wolter pelo auxílio nas análises de micronutrientes.

Aos grandes amigos e colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, pela colaboração nos trabalhos, convívio e amizade.

A Raíssa, Bianca e Fabi, pela dedicação, amizade, pelos momentos de descontração e constante ajuda no laboratório.

Ao colega Carlos Busanello, pela ajuda no desenvolvimento do experimento do estresse por ferro e também pelo auxílio na elaboração dos gráficos.

Ao meu namorado Raffael Gimenez Albaneze, por ter me incentivado sempre, por sua companhia, compreensão, carinho, amor e o mais importante pela paciência dedicada em todos os momentos.

A minha irmã, Patrícia Marini Madruga, pelo companheirismo (conversas intermináveis), pelo apoio e acima de tudo pela amizade e compressão em todas as horas (és o meu maior exemplo!).

A minha mãe, Vanda Maria Marini, por todo o auxílio e compreensão que me proporcionou durante todos esses anos.

A secretária do Programa de Pós – Graduação em Agronomia, Madelon Lopes pela amizade e constante ajuda prestada.

A instituição de fomento à pesquisa CAPES, pela viabilização financeira para implantação deste projeto e financiamento da bolsa de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, da Universidade Federal de Pelotas, por oportunizar o aprimoramento de minha formação profissional.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

MARINI, Naciele. **Estudos fenotípicos e moleculares sobre variabilidade genética, qualidade de grãos e tolerância ao estresse por ferro em arroz.** 2012, 126f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.

Existe a constante necessidade de estudos visando o aumento da produtividade e da qualidade de grãos de arroz, auxiliados por avaliações de tolerância a estresses abióticos e, detecção da variabilidade genética. Portanto, este trabalho teve por objetivo caracterizar famílias mutantes de arroz quanto à tolerância ao estresse por toxidez de ferro, validar uma técnica de marcadores moleculares baseados em retrotransposons, com o intuito de detectar variabilidade genética em genótipos de arroz e analisar a expressão dos genes envolvidos na síntese do amido no endosperma de grãos de arroz. Sendo assim, nove famílias mutantes foram caracterizadas para caracteres fenotípicos e conteúdo de ferro em condições de hidroponia. 20 genótipos foram caracterizados com a técnica de REMAP e três cultivares de arroz tiveram a sua expressão gênica caracterizada por *q*RT-PCR. Os resultados obtidos demonstram que os genótipos BR-IRGA 409 e BRS 7 Taim, apresentam maior acúmulo de Fe^{2+} na parte aérea. As famílias de mutantes CGF-Z-M9-444CD, CGF-Z-M9-328 e CGF-Z-M9-243 foram classificadas neste estudo como tolerantes. O genótipo CGF-Z-M9-444CD foi um dos mutantes que menos acumulou ferro nos tecidos sob condição de estresse, sendo também caracterizado como tolerantes na análise visual. As variáveis comprimento de raiz, número de raiz, ferro, zinco e manganês, sofreram alterações em resposta ao estresse por ferro em condições hidropônicas. No estudo de expressão gênica para qualidade de grão foi possível constatar que constituições genéticas contrastantes quanto ao teor de amilose apresentam expressão diferencial para alguns genes analisados. Alguns destes genes tem seus níveis de expressão alterados no início do desenvolvimento do endosperma, indicando uma maior contribuição no início do enchimento dos grãos e que outros genes tem maior atividade no final do ciclo de desenvolvimento. Existe uma tendência, principalmente, para a cultivar BRS Firmeza de aumento na atividade dos genes estudados aos 20 dias após o florescimento com um declínio aos 25 dias após o florescimento e um aumento novamente aos 30 dias após o florescimento, evidenciando a relação existente entre a atividade destes genes com o caráter “*stay-green*” e a acumulação tardia de amido no endosperma deste

genótipo. Também de acordo com os estudos realizados foi possível mensurar a variabilidade genética no germoplasma de arroz utilizando a técnica REMAP com baixo custo de execução e sem a demanda de equipamentos caros. Assim, é possível identificar indivíduos mais diferentes a nível de DNA, com o objetivo de utilizar essa informação para a realização de cruzamentos entre genitores distantes geneticamente, explorando assim a variabilidade em populações de segregantes transgressivos dentro de programas de melhoramento.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, amilose, expressão gênica, distância genética, estresse abiótico.

Abstract

MARINI, Naciele. **Phenotypic and molecular studies on the genetic variability, grain quality and iron stress tolerance in rice.** 2012, 126f. Thesis (Doctorate) – Graduate Program in Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas – RS.

There is a constant need for studies aiming to increase yield and quality traits in rice, which have to consider abiotic stress tolerance and genetic variability. This work had as objective to characterize rice mutant families regarding rice iron stress tolerance and validate a technique based on retrotransposons with the goal of detecting genetic variability in rice. Also, to analyse gene expression of genes involved in starch synthesis in the rice grain. Therefore, nine mutant families were characterized for phenotypic traits and iron content in hydroponic conditions. Twenty genotypes were molecularly characterized with the REMAP technique and three cultivars were analysed the profiled for starch biosynthesis related gene expression by *q*RT-PCR. The results obtained demonstrate that the genotypes BR-IRGA 409 and BRS7-Taim characterized as sensitive presented a higher accumulation of Fe^{2+} in the shoots. The mutant families CGF-Z-M9-444CD, CGF-Z-M9-328 and CGF-Z-M9-243, were ranked in this study as tolerant. The genotype CGF-Z-M9-444CD was one of the mutants that accumulated less iron in the tissues under stress conditions, being also characterized as resistant in the phenotypic analysis. The variables root length, number of roots, iron, zinc and manganese, were altered in response to hydroponic culture growth with excess iron. In the gene expression study, it was possible to detect contrasting genotypes regarding amylose content presented differential expression for some of the analysed genes. Some of these genes have their expression levels altered at the beginning of starch biosynthesis, suggesting a higher contribution at the beginning of grain filling and other genes at the end of grain maturation. There is a tendency, mainly, for the cultivar BRS Firmeza, to increase the activity of studied genes 20 days after flowering with a decrease at 25 days after flowering and a new increase at 30 days after flowering, indicating an association between the activity of these genes and the “*stay-green*” character and the late starch accumulation in this genotype. Also, according with the studies performed, it was possible to measure the genetic variability in the rice germplasm used using the REMAP with a combination of low cost and simple protocols. Therefore, it is possible to discriminate genotypes at DNA level with the goal of predicting genetic distance

and directed crosses between elite genotypes, thus exploiting population variability and transgressive segregants within breeding programs.

Keywords: *Oryza sativa*, amylose, gene expression, genetic distance, abiotic stress.

Lista de Figuras

CAPÍTULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – QUALIDADE DE GRÃOS DE ARROZ

- Figura 1. (A) Estrutura da amilose com cadeias lineares, contendo ligações glicosídicas α -1,4 (B) Estrutura da amilopectina com cadeias lineares, contendo ligações α -1,4 e α -1,6 CGF/FAEM/UFPel, 2012.....31
- Figura 2. Metabolismo da síntese do Amido. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....34

CAPÍTULO II. PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DO AMIDO EM GRÃOS DE ARROZ DIAS APÓS O FLORESCIMENTO

- Figura 1. Cálculo referente a eficiência do *primer* utilizado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....57
- Figura 2. Gráfico com o perfil de expressão do gene *OsAGPL2*, envolvido na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....62
- Figura 3. Gráfico com os perfis de expressão dos genes *OsSSI* (A), *OsSSIV* (B) e *OsGBSSI* (C), envolvidos na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....65
- Figura 4. Gráfico com o perfil de expressão do gene *OsBEIIb*, envolvido na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....66
- Figura 5. Gráfico com os perfis de expressão dos genes *OsPUL* (A), *OsISA1* (B) e *OsISA2* (C), envolvidos na síntese do amido, analisado em cinco tempos

de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....69

Figura 6. Gráfico com o perfil de expressão do gene *OsGPT1*, envolvido na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....70

Figura 7. Perfil de expressão dos genes envolvidos na síntese do amido, analisados em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado (A) Nipponbare, (B) BRS Pampa e (C) BRS Firmeza, através da técnica de qPCR e representado por escalas que variam de 1 - 180, utilizando o *Mult Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003). Uma extremidade da escala representada pela cor verde claro indica o menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor vermelha claro indica o maior nível de expressão. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....71

CAPÍTULO III. CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE ARROZ TOLERANTES AO ESTRESSE POR FERRO

Figura 1. Concentração dos micronutrientes: A) Ferro (Fe), B) Cobre (Cu), C) Zinco (Zn) e D) Manganês (Mn), na parte aérea de 12 genótipos de arroz submetidos à condição controle (T1) e condição de estresse por ferro (T2). CGF/FAEM/UFPel, 2012.....88

Figura 2. Avaliação morfológica dos caracteres: A) Comprimento de parte aérea (CPA), B) comprimento de raiz (CR), C) comprimento de coleótilo (CC) e D) número de raiz (NR) de 12 genótipos de arroz, submetidos à condição controle (T1) e de estresse por ferro (T2). CGF/ FAEM/UFPel, 2012.....92

CAPÍTULO IV. VARIABILIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE ARROZ IRRIGADO UTILIZANDO A TÉCNICA IRAP-REMAP

- Figura 1. Perfil do padrão de bandas obtido, em gel de agarose (2%), referente as combinações de *primers* que foram selecionadas. CGF/FAEM/UFPeI, 2012.....107
- Figura 2. Perfil do padrão de bandas obtido, em gel de acrilamida (6%), referente as 83 combinações de *primers* testadas. CGF/FAEM/UFPeI, 2012...107
- Figura 3. Dendrograma de 20 genótipos de arroz irrigado obtido a partir da análise de REMAP utilizando o índice de coincidência simples ("*simple matching*") e o método de agrupamento UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos se agruparam em 1000 ciclos de análise de *bootstrapping* utilizando o programa WINBOOT. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,90. CGF/FAEM/UFPEL, 2012.....112

Lista de Tabelas

CAPÍTULO II. PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DO AMIDO EM GRÃOS DE ARROZ DIAS APÓS O FLORESCIMENTO

- Tabela 1. Informações referentes aos genes e suas sequências de nucleotídeos utilizados nas análises de expressão dos genes em *qRT-PCR*. CGF/FAEM/UFPEL, 2012.....58
- Tabela 2. Resultados do experimento de validação dos genes *OsSSI*, *OsSSIIIa*, *OsSIVb*, *OsBEI*, *OsBEIIb*, *OsGBSSI*, *OsAGPS2b*, *OsAGPL2*, *OsGPT1*, *OsISA1*, *OsISA2*, *OsISA3* e *OsPUL* em relação ao padrão de referência *OsUBQ*, realizada a partir de diluições seriadas de cDNA dos genótipos BRS Pampa, BRS Firmeza e Nipponbare durante os tempos de coleta. CGF/FAEM/UFPEL, 2012.....59

CAPÍTULO III. CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE ARROZ TOLERANTES AO ESTRESSE POR FERRO

- Tabela 1. Resumo da análise de variância, para as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleótilo (CC), comprimento de raiz (CR), em cm, número de raiz (NR), teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg Kg⁻¹, de 12 genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1= solução nutritiva padrão com 2 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e de estresse por ferro (T2= 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), em solução hidropônica. CGF/FAEM/UFPEL/ 2012.....83
- Tabela 2. Resposta das famílias mutantes de arroz irrigado para as variáveis: teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg Kg⁻¹, de 12 genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1= solução nutritiva padrão com 2 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e de estresse por ferro (T2= 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), em solução hidropônica. CGF/FAEM/UFPEL/ 2012.....86

Tabela 3.	Resposta das famílias mutantes de arroz irrigado para as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleótilo (CC), comprimento de raiz (CR), em cm e número de raiz (NR), de 12 genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1= solução nutritiva padrão com 2 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O) e de estresse por ferro (T2= 2000 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O), em solução hidropônica. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....	90
Tabela 4.	Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleótilo (CC), comprimento de raiz (CR), em cm, número de raiz (NR), teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg Kg ⁻¹ , de 12 genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1) e de estresse por excesso de ferro (T2), em solução hidropônica. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....	93
Tabela 5.	Sintomas visuais avaliados em 12 genótipos de arroz irrigado sob o tratamento de estresse por ferro (T2), em solução hidropônica. As graduações obedecem a uma escala variável de 0 a 9, adaptada do Standard Evaluation System for Rice utilizada pelo IRRI. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....	94

CAPÍTULO IV. VARIABILIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE ARROZ IRRIGADO UTILIZANDO A TÉCNICA IRAP-REMAP

Tabela 1.	Genótipos utilizados para análise da distância genética. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....	104
Tabela 2.	Lista de <i>Primers</i> para análise de distância genética. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....	106
Tabela 3.	Combinações de <i>primers</i> selecionados para análise de distância genética. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....	108
Tabela 4.	Matriz de dissimilaridade genética dos 20 genótipos de arroz, obtida pelo complemento aritmético do coeficiente de similaridade. CGF/FAEM/UFPel, 2012.....	111

Sumário

Resumo.....	8
Abstract.....	10
Lista de figuras.....	12
Lista de tabelas.....	15
1. Introdução geral.....	19
1.2 Referências.....	22
2. Capítulo I – Revisão Bibliográfica – Qualidade de grãos de arroz.....	26
2.1 A cultura do arroz.....	26
2.2 Características morfológicas e físico-químicas do grão de arroz.....	27
2.3 Qualidade de grão de arroz.....	29
2.4 Amido.....	30
2.5 Amilose e Amilopectina.....	31
2.6 Temperatura de Gelatinização.....	33
2.7 Enzimas da síntese do amido.....	34
2.8 Adenosina Difosfato glicose pirofosforilase.....	35
2.9 Amido Sintases.....	36
2.10 Enzimas Desramificadoras.....	39
2.11 Enzimas Ramificadoras.....	40
2.12 Melhoramento genético visando a qualidade industrial do arroz.....	41
2.13 Referências.....	42
3. Capítulo II – Expressão gênica diferencial no metabolismo do amido entre genótipos de arroz com diferenças na qualidade de grãos.....	52
3.1 Introdução.....	52
3.2 Material e Métodos.....	54
3.3 Resultados e Discussão.....	60
3.4 Conclusões.....	73
3.5 Referências.....	73

4.	Capítulo III – Caracterização de mutantes de arroz tolerantes ao estresse por ferro.....	79
4.1	Introdução.....	79
4.2	Material e Métodos.....	81
4.3	Resultados e Discussão.....	83
4.4	Conclusões.....	97
4.5	Referências.....	97
5.	Capítulo IV – Variabilidade genética em genótipos de arroz irrigado utilizando as técnicas IRAP e REMAP.....	101
5.1	Introdução.....	101
5.2	Material e Métodos.....	105
5.3	Resultados e Discussão.....	110
5.4	Conclusões.....	114
5.5	Referências.....	115
	Apêndices.....	120
	Vitae.....	126

1. Introdução geral

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo o principal alimento para mais da metade da população mundial, além de desempenhar um importante papel tanto no âmbito social e econômico quanto cultural. Atualmente é o segundo cereal mais produzido no mundo (FAO, 2012).

O Estado do Rio Grande do Sul é responsável pela maior produção de arroz no Brasil, contribuindo com cerca de 60% na safra de 2011/2012 (CONAB, 2012).

Cada vez mais os produtores procuram por cultivares produtivas, tolerantes aos estresses bióticos e abióticos e que também produzam um arroz longo fino e de ótima qualidade industrial para atender as exigências do mercado (CONAB, 2012).

Sendo assim, para estabelecer uma melhor estratégia de produção de arroz no Brasil é fundamental solucionar os problemas relacionados ao processo produtivo, e também conhecer minuciosamente as características que definem os padrões de qualidade nos mercados brasileiro e internacional. Atualmente, quantidade e qualidade são aspectos importantes para todos os agentes envolvidos na produção, comercialização e consumo do arroz.

O Estado, o cultivo irrigado representa a principal e mais produtiva forma de cultivo de arroz. Em virtude da inundação do solo, como requer o sistema irrigado, somado à principal característica de solos do tipo hidromórfico que é a drenagem natural deficiente e com elevados teores de ferro, provenientes de um material de origem rico no mineral (BRASIL, 2009), freqüentemente observa-se um aumento da disponibilidade de Fe^{2+} na solução do solo a níveis que podem ser tóxicos as plantas cultivadas nestas condições (BECANA et al., 1998).

Atualmente essa toxidez causada pelo excesso de ferro tem sido um dos entraves para alta produtividade, sendo relacionado como um dos cinco estresses abióticos mais importante a limitar a produção de arroz irrigado em nível mundial (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000; WARD, 2001), podendo levar a perdas

consideráveis na produção que podem representar uma alta redução no rendimento (BENCKISER et al., 1982; SAHRAWAT; DIATTA, 1996; AUDEBERT; SAHRAWAT, 2004) dependendo do nível da toxidez e da tolerância das cultivares de arroz. De acordo com Bacha (1993), nas condições brasileiras as reduções na produtividade podem chegar a 80%. No Rio Grande do Sul segundo o Instituto Rio-Grandense do Arroz, esta redução pode alcançar até 20% (IRGA, 2004).

A seleção de genitores e a caracterização da variabilidade genética existente são decisivas para o incremento de eficiência em programas de melhoramento, pois uma das principais necessidades é a identificação de plantas que possuam genes e/ou alelos responsáveis por determinada característica de interesse.

A obtenção de variabilidade mediante o emprego de agentes mutagênicos químicos ou físicos (radiações) tem sido amplamente empregada no melhoramento vegetal em função da capacidade de alterar uma ou mais características desejáveis, podendo assim é possível melhorar as cultivares já existentes e desenvolvendo novos genótipos (MALUSZYNSKI et al., 1998).

Entretanto, ao induzir a mutação não se pode saber ao certo qual característica esta planta virá a apresentar, pois a mutação não é direcionada a genes específicos, não se tem controle de quais regiões do genoma poderão sofrer alterações, positivas ou negativas. Portanto, é necessário fazer vários testes entre um grande número de indivíduos submetidos ao agente mutagênico, fazendo a seleção daqueles que apresentam a característica desejada.

Por outro lado, a identificação da variabilidade genética existente nos genótipos também é de grande importância para o melhoramento genético vegetal. A utilização de marcadores moleculares eficientes irá permitir que os melhoristas estudem com maior precisão e confiabilidade o caráter desejado, pois a variabilidade é acessada e selecionada em nível de DNA, permitindo assim a análise direta do genoma, sem a interferência do ambiente. Através deles é possível analisar cada genótipo de interesse, possibilitando assim a obtenção de informações relativas à variabilidade existente, identificação de genótipos, genes e alelos específicos associados a características fenotípicas de interesse agrônomo.

Outra característica importante a ser estudada, e que vem sendo foco em estudos nos centros de pesquisa em melhoramento de arroz irrigado é a qualidade de grãos.

Uma das principais características do arroz é a alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas, minerais e um baixo teor de lipídios (WALTER et al., 2008). O amido é o produto final do processo fotossintético e constitui a principal reserva de carbono das plantas. Sua formação ocorre devido à atividade coordenada de algumas enzimas, tanto nas organelas fotossinteticamente ativas, onde o amido é reserva temporária, quanto nos amiloplastos, em órgãos de reserva (CEREDA, 2001). A sua quantidade no grão de arroz pode variar entre diferentes cultivares devido a fatores genéticos e ambientais (FREI et al., 2003).

O amido é formado basicamente por dois tipos de macromoléculas, a amilose e a amilopectina. Apresentando-se na forma de grânulos, com formas bastante distintas (ZOBEL, 1988), o amido deve muito de sua funcionalidade a estas duas macromoléculas, assim como à organização física delas dentro da estrutura granular (BILIADERIS, 1991). As principais diferenças que existem na composição do amido e que influenciam as propriedades físico-químicas do arroz são causadas pela variação na proporção de amilose e amilopectina (ZHOU et al., 2002).

O teor de amilose influencia diretamente na qualidade funcional, industrial e sensorial do arroz, sendo considerado um dos principais parâmetros para a qualidade tecnológica e culinária do arroz (FERREIRA et al., 2005). De forma geral, grãos com maior teor de amilose apresentam textura mais firme após o cozimento, sendo preferidos em diversos países, como o Brasil, e por isso essa característica é avaliada durante o desenvolvimento de cultivares (WALTER et al., 2008). Entretanto, outros fatores, como a estrutura das cadeias de amilopectina e o teor de proteína também influenciam essa característica (ONG; BLANSHARD, 1995).

Além disto, o alto teor de amilose associado a outros componentes do arroz, presentes no farelo e no endosperma, tem sido relacionados a diferentes efeitos no organismo, benéficos à saúde, como auxílio no controle da glicose sanguínea, redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, entre outros, auxiliando na prevenção e controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares (MILLER et al., 1992; KOIDE et al., 1996; QURESHI et al., 1997; RONG et al., 1997; XIA et al., 2003). Por isso, cereais com alto teor de amilose atraem uma atenção considerável, em razão de seus potenciais benefícios à saúde, junto com seu uso industrial (JOBLING, 2004; MORELL; MYERS, 2005; RAHMAN et al., 2007).

Estudos prévios sugeriram que algumas enzimas desempenham um papel importante na síntese de amido tanto nos colmos como no endosperma de arroz. Estas compreendem a AGPase (ADP - glicose pirofosforilase), SS (amido sintase), SBE (enzima de ramificação do amido) e DBE (enzima de desramificação do amido) (WATANABE et al., 1997; NAKAMURA, 2002; TANAKA, 2004; HIRANO et al., 1998; OHDAN et al., 2005, HANASHIRO, 2008).

Com isso torna-se importante verificar o perfil de expressão dos locos destas famílias gênicas que codificam estas enzimas relacionadas à biossíntese do amido e identificar os locos e/ou alelos responsáveis pelas plantas com maiores teores de amilose, e com este estudo, indicar quais genes podem ser utilizados como marcadores moleculares na seleção assistida em programas de melhoramento genético de arroz.

Considerando a necessidade e a importância de estudos visando o aumento da produtividade, a tolerância a estresses abióticos e a qualidade dos grãos de arroz, este trabalho teve por objetivo: 1) caracterizar famílias mutantes de arroz quanto à tolerância ao estresse por toxidez de ferro, 2) avaliar uma técnica de marcadores moleculares, para detectar variabilidade genética em genótipos de arroz para prever cruzamentos com associação genética e/ou dissociação genética e 3) prospecção de marcadores moleculares para seleção assistida da qualidade de grãos, através do estudo da expressão dos genes envolvidos na síntese do amido no endosperma de arroz após o florescimento.

1.2 Referências

AUDEBERT, A.; SAHRAWAT, K. L. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 23, p.1877-1885, 2000.

BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. 19, 1993. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camboriú. **Anais**. Florianópolis: EMPASC, 1993. p.156-159.

BECANA M.; MORAN J.F.; ITURBE-ORMAETXE I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: Toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, v.201, p.137-147. 1998.

BENCKISER, G.; OTTOW, J.C.G.; SANTIAGO, S.; WATANABE, I. hysiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper

series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines.1982.

BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food constituents, Canadian. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 69, n.1, p. 60-78. 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 2009.

CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. Sao Paulo: Fundação Cargill, (Serie: Culturas de Tuberosas Amilaceas Latino-Americanas) 221 p. 2002.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 06 de Junho de 2012.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**, Manila, Philippines.2000.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical databases**. Disponível em: <http://www.fao.org>. 2012.

FERREIRA, C.M. et al. **Qualidade do arroz no Brasil: evolução e padronização**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 61p. 2005.

FREI, M. et al. Studies on in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v.83, p.395-402. 2003.

HANASHIRO, I.; ITOH, K.; KURATOMI, Y.; YAMAZAKI, M.; IGARASHI, T.; MATSUGASAKO, J.I.; TAKEDA, Y. Granule-bound starch synthase I is responsible for biosynthesis of extra-long unit chains of amylopectin in rice. **Plant and Cell Physiology**, v.49, p.925–933. 2008.

HIRANO, H.-Y.; EIGUCHI, M.; SANO, Y. A single base change altered the regulation of the Waxy gene at the posttranscriptional level during the domestication of rice. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p.978–987. 1998.

INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ (IRGA). **Arroz irrigado no RS: área cultivada, produção, nº de engenhos e beneficiamento**. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.210–218. 2004.

KOIDE, T. et al. Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v.11, n.4, p.273-277. 1996.

MALUSZYNSKI, M. Crop germoplasm enhancement through mutation techniques. In: RUTGER JN, ROBINSON J.F.; DILDAY, R.H. (eds.) **Proceedings of the**

International Symposium on Rice Germplasm Evaluation and Enhancement, Arkansas, USA. 1998.

MILLER, J. B. et al. Rice: a high or low glycemic index food? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.1034-1036, 1992.

MORELL, M.K.; MYERS, A.M. Towards the rational design of cereal starches. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.204–210. 2005.

NAKAMURA, Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. **Plant and Cell Physiology**, v.43, p.718–725. 2002.

OHDAN, T.; FRANCISCO, P.B.; SAWADA, T.; HIROSE, T.; TERAOKA, T.; SATOH, H.; NAKAMURA, Y. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.3229–3244. 2005.

ONG, M. H.; BLANSHARD, J. M. V. Texture determinants in cooked, parboiled rice I: rice starch amylose and the fine structure of amylopectin. **Journal of Cereal Science**, v.21, p.251- 260. 1995.

QURESHI, A. A. et al. Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic humans. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.8, p.290-298. 1997.

RAHMAN, S.; NAKAMURA, Y.; LI, Z.; CLARKE, B.; FUJITA, N.; MUKAI, Y.; YAMAMOTO M.; REGINA, A.; TAN, Z.; KAWASAKI, S. The sugary-type isoamylase gene from rice and *Aegilops tauschii*: characterization and comparison with maize and *Arabidopsis*. **Genome**, v.46, p.496–506. 2003.

RONG, N. et al. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. **Lipids**, v.32, n.3, p.303-309. 1997.

SAHRAWAT, K. L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association: **Annual Report 1995**, p. 34–35.1996.

TANAKA, N.; FUJITA, N.; NISHI, A.; SATOH, H.; HOSAKA, Y.; UGAKI, M.; KAWASAKI, S.; NAKAMURA, Y. The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. **Plant Biotechnology Journal** 2, p.507–516. 2004.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p.1184-1192. 2008.

WARDA. **Annual Report 2000**. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.

WATANABE, K.; HATA, Y.; KIZAKI, H.; KATSUBE, Y.; SUZUKI, Y. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural

characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. **Journal of Molecular Biology**, v. 269, n. 1, p. 142-153. 1997.

XIA, M. et al. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. **Journal of Nutrition**, v.133, n.3, p.744-751. 2003.

ZHOU, Z. et al. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868. 2002.

ZOBEL, H.F. Starch crystal transformations and their industrial importance. **Starch/Stärke**, v. 40, n. 1, p. 1-7. 1998.

2. CAPITULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

QUALIDADE DE GRÃOS DE ARROZ

2.1 A cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo o principal alimento para mais da metade da população mundial, que o utilizam como fonte de calorias diariamente. Além disso, desempenha um importante papel tanto a âmbito social e econômico quanto cultural, caracterizado como o segundo cereal mais cultivado e produzido no mundo, com um total de 650 milhões de toneladas produzidos. O milho apresenta-se no topo da lista com uma produção média de 700 milhões de toneladas, e em terceiro lugar o trigo com uma média de 600 milhões de toneladas (FAO, 2012).

Atualmente, cerca de 90% do arroz mundial é produzido e consumido nos países asiáticos. O Brasil é o maior produtor fora da Ásia (ocupando a nona posição mundial), com uma área cultivada na safra 2011/12 de 2.426,7 mil hectares, com uma produtividade média de 4.779 kg ha⁻¹. A produção nacional está estimada em 11.599,5 mil toneladas. Desta forma, o Brasil se destaca como um grande produtor e consumidor de arroz, e, neste contexto, a região Sul está inserida com grande participação, responsável por 66,7% (8.984,1 mil toneladas) da produção nacional, destes 57,5% (7.739,6 mil toneladas) são produzidos pelo Rio Grande do Sul (CONAB, 2012).

O gênero *Oryza* inclui ainda cerca de 20 outras espécies (IRRI, 2012). Duas espécies tem maior importância: *Oryza sativa*, cultivada em todo o mundo e *Oryza glaberrima* Steud., cultivada em regiões da África Ocidental.

Cerca de 70% da produção de arroz no Brasil é no sistema irrigado por inundação enquanto o sistema de sequeiro (também conhecido como cultivo de terras altas) é responsável por cerca de 30%. No Rio Grande do Sul, o cultivo irrigado por inundação representa a principal forma de cultivo de arroz (CONAB, 2012).

Além de sua importância social e econômica, o arroz é uma planta modelo entre as monocotiledôneas, pois apresenta um genoma pequeno (cerca de 430 Mbp) que foi completamente seqüenciado para a cultivar Nipponbare subespécie *japonica* (~ 380 Mbp) (GOFF et al., 2002; IRGSP, 2005) e parcialmente para a cultivar 93-11 subespécie *indica* (YU et al., 2002). Além disto, a espécie apresenta anotação gênica avançada e bancos de dados com informações genômicas constantemente atualizadas.

Estima-se que a produção mundial de arroz deve aumentar em 30% nos próximos 20 anos para atender as demandas projetadas de crescimento populacional e desenvolvimento econômico (IRGSP, 2005). No entanto, cada vez mais os produtores brasileiros procuram não somente por cultivares produtivas, mas também tolerantes aos estresses bióticos e abióticos e que estas produzam um arroz longo fino e de ótima qualidade industrial para atender as exigências do mercado (CONAB, 2012).

Em vista disso, os programas de pesquisa e melhoramento genético de arroz irrigado conduzidos no Brasil tem adotado estratégias metodológicas que agrupem biotecnologia e melhoramento convencional, visando desenvolver genótipos comerciais de alta produtividade e estabilidade (adaptadas aos sistemas de cultivo; resistentes as moléstias e pragas; tolerantes ao frio, à salinidade e toxicidade por ferro) e com qualidade de grãos que atenda a preferência, inicialmente do mercado interno e posteriormente, do mercado externo (EMBRAPA CPACT, 2012).

2.2 Características morfológicas e físico-químicas do grão de arroz

O grão de arroz exibe propriedades físico-químicas diferentes, dependendo da variedade e da qualidade do amido, as quais especialmente influenciam nas suas propriedades culinárias (JULIANO; BECHTEL, 1985). O grão de arroz consiste da cariopse e de uma camada protetora, a casca. A casca é composta de duas folhas modificadas, a pálea e a lema, e corresponde a cerca de 20% do peso do grão. A

cariopse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona. A camada de aleurona apresenta duas estruturas de armazenamento proeminentes, os grãos de aleurona (corpos protéicos) e os corpos lipídicos. O embrião ou gérmen está localizado no lado ventral na base do grão, é rico em proteínas e lipídios. O endosperma constitui a maior parte do grão e consiste de células ricas em grânulos de amido e com alguns corpos protéicos (JULIANO; BECHTEL, 1985).

O arroz é constituído principalmente por amido, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas. Entretanto, a composição do grão e de suas frações está sujeita a diferenças oriundas do genótipo, interações com o ambiente, manejo, processamento no engenho e armazenamento (ZHOU et al., 2002), produzindo grãos com características diferenciadas. Além disso, os componentes químicos não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido.

A composição química do arroz sofre variações em função das diferentes formas de processamento do grão. Através do descascamento, separa-se a casca da cariopse, obtendo-se o arroz integral. Este pode ser polido para remoção do farelo (pericarpo, tegumento, camada de aleurona e gérmen), que representa 8,5 - 14,8% do arroz integral (JULIANO; BECHTEL, 1985), obtendo-se o arroz branco polido. Os grãos também podem ser submetidos à parboilização, processo hidrotérmico através do qual se obtém o arroz parboilizado (reação de Maillard), o qual pode ser consumido na forma integral ou polido.

Observa-se que o arroz polido cru contém basicamente carboidratos (80%). O polimento do grão integral provoca perdas consideráveis de certos nutrientes, tais como lipídios e tiamina (cerca de 80%), fibra e niacina (até quase 70%), ferro e zinco (em torno de 50%). O valor nutritivo do arroz integral é superior ao do arroz polido, mesmo considerando que o grão integral contém ácido fólico em suas camadas periféricas, que reduz a biodisponibilidade de minerais como o ferro e o zinco (HUNT et al., 2002; WYATT; TRIANA-TEJAS, 1994). Dessa forma, o polimento resulta em redução no teor de nutrientes, exceto de amido, originando as diferenças na composição entre o arroz integral e o polido.

2.3 Qualidade de grãos de arroz

Qualidade de arroz é uma característica subjetiva e sujeita aos padrões estabelecidos nos diferentes países, que por sua vez, são afetados pelos padrões culturais e pela sua forma de utilização na alimentação. A preferência do consumidor por esse cereal, via de regra, está associada a aspectos econômicos, tradicionais, variando de país para país e até mesmo de região para região dentro de um mesmo país (PEREIRA et al., 2007).

De forma geral, pode-se dizer que o termo qualidade é aplicado largamente, para categorizar o comportamento do amido contido no endosperma do grão e as suas dimensões (PURI; SIDDIQ, 1980; CASTRO et al., 1999).

A qualidade de grão é uma característica complexa, definida por diferentes variáveis e controlada por vários genes em interação com o ambiente. O melhoramento convencional para qualidade de grão geralmente enfrenta grandes obstáculos. Esta dificuldade advém do estágio de desenvolvimento da planta em que é possível selecionar para qualidade de grão. Ao contrário de outras características da planta, que podem ser selecionadas antes do florescimento, favorecendo o ganho de seleção por ciclo, a seleção para qualidade de grão só pode ser realizada após a maturação, colheita e avaliação dos grãos. Um dos obstáculos refere-se a avaliação de qualidade, pois esta necessita de quantidade razoável de grãos. Sendo que nas fases iniciais de um programa de melhoramento a quantidade de grãos obtida por linhagem é limitada. Em geral, avaliações de qualidade de grãos só ocorrem na fase final do programa, quando maiores quantidades são disponíveis.

Portanto, utilizar métodos que facilitem e/ou aumentem a eficiência de seleção para qualidade de grão, contornando estes obstáculos, é de extrema importância para os programas de melhoramento genético. Por isso, torna-se fundamental e necessário ter um maior conhecimento da composição química, fisiologia, bioquímica e do controle genético do carácter para alcançar este objetivo.

2.4 Amido

O amido representa a maior parte do carboidrato estocado no grão de arroz, pois os cereais são fonte rica em amido, uma vez que armazenam este nutriente para suprir as necessidades energéticas durante a germinação. Em consequência disso, estes grãos também são usados na alimentação humana como fonte de energia. Uma vez que o teor de amido influencia diretamente no valor calórico do alimento, a quantificação de seus teores poderá ser utilizada como indicativo indireto de valor nutricional.

O amido é um polissacarídeo, que se apresenta na forma de grânulos com tamanho variável e composto por moléculas de glicose, estruturalmente diferentes, cujas propriedades são determinadas pela relativa disposição dessas moléculas na cadeia. Quando em estrutura linear unida por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 compõe a amilose, quando em estrutura ramificada, é constituída de ligações glicosídicas do tipo α -1,4, ligadas em pontes α -1,6, e compõe a amilopectina (GAO et al., 1996; FAO/WHO, 1997; TESTER et al., 2004; HIZUKURI et al., 2006; STONE; MORELL, 2009).

A quantidade de amido no grão de arroz pode variar entre diferentes genótipos devido a fatores genéticos, do ambiente e das interações genótipo versus ambiente. Além disso, o processamento também influencia o percentual de amido. Todos estes fatores tem impacto na composição do amido e influenciam profundamente as propriedades físico-químicas do arroz causando variação na proporção de amilose e amilopectina.

O amido de arroz pode apresentar diferentes quantidades de amilose variando entre 1% a 32%, e por isso as variedades podem ser classificadas em quatro grupos: ceroso (1-2%), baixo teor de amilose (3-19%), conteúdo intermediário de amilose (20-24%) e alto teor de amilose (>25%) (COFFMAN; JULIANO, 1987; TECHAWIPHARAT et al., 2008).

Portanto, o conhecimento do controle genético do conteúdo e composição estrutural de amido no grão tem, grande importância no entendimento da qualidade de grãos de arroz.

2.5 Amilose e Amilopectina

A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por uma cadeia de de cerca de 250 a 300 unidades de glicose unida por ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 1A) (LIU, 2005). A molécula da amilose não possui ramificações e, no espaço, assume conformação helicoidal (forma de hélice) (BULÉON et al., 1998). A presença de átomos de hidrogênio no interior da hélice torna-o hidrofóbico e permite que a amilose forme complexos com ácidos graxos livres, com componentes glicerídeos dos ácidos graxos, com alguns álcoois e com iodo. A complexação com iodo é uma importante ferramenta de diagnóstico para caracterização do amido. Pois, esta estrutura permite a detecção e quantificação de amilose em testes simples de coloração com solução de iodo. As moléculas do iodo se ligam ordenadamente dentro da estrutura helicoidal formada pela amilose. Na presença da amilose, uma cor azul-escuro é observada em reação com o iodo.

A amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada e consiste em cadeias lineares mais curtas de ligações α -1,4 contendo 10 a 60 unidades de glicose ligadas a cadeias laterais com 15 a 45 unidades de glicose com uma média de 5% de ligações α -1,6 nos pontos de ramificação (Figura 1B) (VAN DER MAAREL et al., 2002). A amilopectina possui um alto grau de organização estrutural, onde regiões sem ramificação alternam com regiões altamente ramificadas, sendo assim a amilopectina não apresenta estrutura helicoidal devido à presença destas ramificações. A amilopectina é o componente principal no endosperma do grão, compõe aproximadamente 70% a 80% do amido de estocagem e esta estrutura é responsável pela organização cristalina do amido granular (GALLANT e al., 1997).

O arroz pode ter diferentes quantidades de amilose de acordo com a seguinte classificação: grão ceroso (1-2%), baixo teor de amilose (3-19%), conteúdo intermediário de amilose (20-24%) e alto teor de amilose (>25%) (COFFMAN; JULIANO, 1987; TECHAWIPHARAT et al., 2008). Em presença de iodo a amilopectina dá coloração avermelhada e é estável em soluções aquosas diluídas.

Em arroz, o teor de amilose (TA) no amido do endosperma é uma das características importantes, correlacionada com as propriedades texturais, como maciez, coesão, cor, brilho e volume de expansão (JULIANO, 1985). Relaciona-se,

portanto, com as mudanças que ocorrem durante o processo de cocção e determinam a qualidade culinária (FERREIRA et al., 2005).

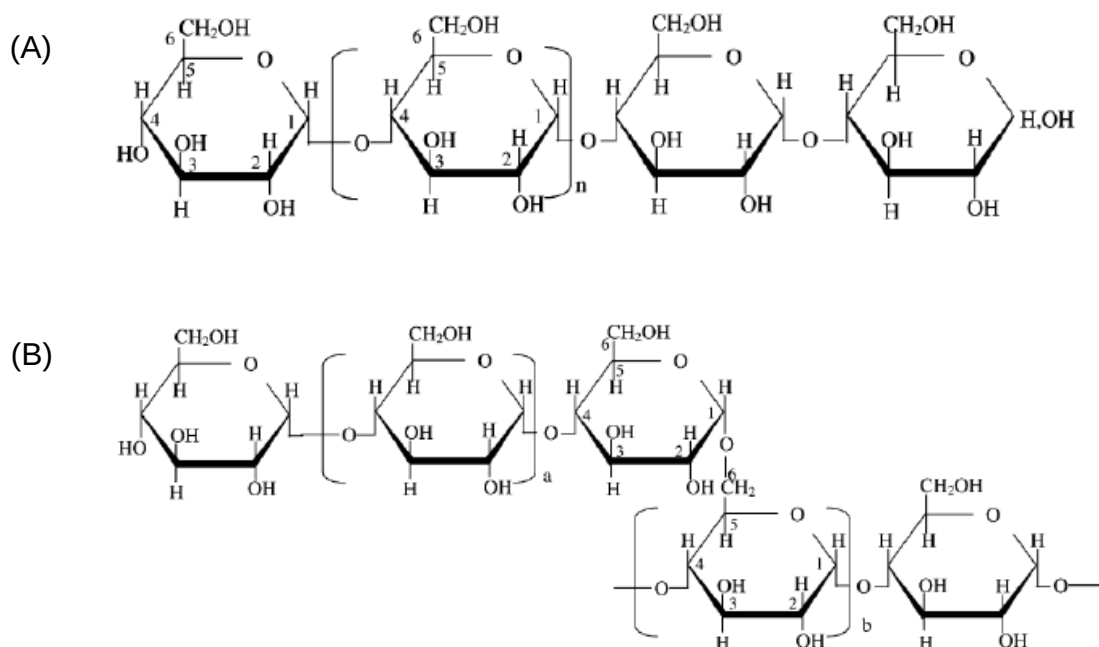


Figura 1. (A) Estrutura da amilose com cadeias lineares, contendo ligações glicosídicas α -1,4 (B) Estrutura da amilopectina com cadeias lineares, contendo ligações α -1,4 e α -1,6. CGF/FAEM/UFPEl 2012. (Fonte: TESTER; KARKALAS, 2002).

De forma geral, grãos com maior teor de amilose apresentam textura mais firme após o cozimento, sendo preferidos em diversos países, como o Brasil, e por isso essa característica é avaliada durante o desenvolvimento de cultivares (WALTER et al., 2008). Entretanto, outros fatores, como a estrutura das cadeias de amilopectina e o teor de proteína também influenciam essa característica (ONG; BLANSHARD, 1995).

A proporção de amilose em relação ao amido total, medido como teor de amilose, também está relacionado com questões genéticas do grupo, ou de subespécies. O grupo *indica* apresenta maior teor de amilose (18-32%), ou seja, grãos mais soltos e menos pegajosos, do que o grupo *japonica* (10-22%), que possui baixo teor de amilose, com grãos mais pegajosos quando o arroz é cozido (LANG; BUU, 2004; AYABE et al., 2009).

Artificialmente, mudanças quanto a este aspecto podem ocorrer também devido à interferência do homem. Por exemplo, melhoristas norte-americanos

estabeleceram que as suas cultivares, do grupo *japonica*, teriam que apresentar, grão longo fino e teor de amilose intermediário (FERREIRA et al., 2005).

Contudo, amidos com elevados níveis de amilose associado a outros componentes do arroz, presentes no farelo e no endosperma, também tem sido relacionados a diferentes efeitos no organismo, benéficos a saúde. Entre eles menor resposta glicêmica, o esvaziamento mais lento do trato gastrointestinal, o aumento da capacidade do corpo queimar gordura, que pode ajudar a manter um peso saudável, como também na redução dos lipídios séricos e da pressão arterial, auxiliando na prevenção e controle de doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares, diferentemente daqueles com baixos níveis de amilose (MILLER et al., 1992; KOIDE et al., 1996; QURESHI et al., 1997; RONG et al., 1997; FREI et al., 2003; XIA et al., 2003; HIGGINS et al., 2004; BEHALL; SCHOLFIELD, 2005).

Por isso, cereais com alto teor de amilose estão atraindo uma atenção considerável, em razão de seus potenciais benefícios a saúde, junto com seu uso industrial (JOBILING, 2004; MORELL; MYERS, 2005; RAHMAN et al., 2007).

2.6 Temperatura de Gelatinização

Uma propriedade importante na qualidade de grãos que é afetada pela variação no conteúdo de amilose do grão, é a temperatura de gelatinização, conhecida como TG, também denominada reação alcalina ou digestão alcalina ou ainda “alkali-test”, é a propriedade do amido que determina o tempo necessário para o cozimento.

A temperatura de gelatinização é a medida de temperatura na qual 90% dos grânulos de amido são gelatinizados ou inchados irreversivelmente na água quente, podendo variar de 55°C a 79°C. É nesta temperatura que os grãos começam a absorver a água durante o cozimento, dando início ao processo de amolecimento. A TG é um teste que avalia a resistência do grão ao cozimento, onde a quantidade de amido determina quanto tempo levará este processo.

Quando um genótipo apresenta a TG entre 55 e 68°C (baixa) ou 69 a 74°C (intermediária), necessitam de menor tempo e quantidade inferior de água para o cozimento do arroz, resultando em menor gasto de energia. Quando a TG é alta (em torno de 75 e 80° C), os grãos precisam de mais água e maior tempo para a cocção, em geral permanecendo semi-duros após o cozimento e causando certo desconforto

quando mastigados, estando este fator diretamente correlacionado ao baixo teor de amilose (PEREIRA, 2004; FERREIRA et al., 2005).

2.7 Enzimas da síntese do amido

É extremamente necessário o completo entendimento dos mecanismos das enzimas que atuam na biossíntese do amido. Existe uma maior complexidade na biossíntese de amido nos vegetais, do que na biossíntese do glicogênio nos animais, embora este último seja formado por uma estrutura ramificada, assim como a amilopectina do amido, unida por ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6, o glicogênio pode ser sintetizado por uma forma única de glicogênio sintase, e uma enzima de ramificação de glicogênio. Já o amido em vegetais é sintetizado por vários tipos de enzimas (NAKAMURA, 2002).

Quatro classes de enzimas catalisam as reações de síntese do amido: AGPase, SS, SBE e DBE. A enzima ADP – glicose pirofosforilase (AGPase) catalisa a produção do substrato comum (ADP-glicose), para a síntese da amilose e da amilopectina, mesmo sendo estas sintetizadas por vias diferentes. As enzimas ramificadoras do amido (SBE) atuam na ramificação das cadeias de glicose, enquanto enzimas desramificadoras do amido (DBE) atuam na linearização das cadeias de glicose.

O grupo das amido sintases (SS), dividem-se em amido sintase ligada ao grânulo do amido (GBSS – amido sintase insolúvel), controla a síntese de amilose no endosperma do arroz, enquanto que a amido sintase solúvel (SS) juntamente com as SBE e DBE atuam no controle da síntese da amilopectina (Figura 2). Algumas destas enzimas possuem múltiplas isoformas, codificadas por diferentes locos da família gênica localizados em cromossomos distintos, sendo que cada loco desempenha um papel distinto na biossíntese do amido (SMITH et al., 1997; COLLEONI et al., 1999; MYERS et al., 2000; NAKAMURA, 2002; BALL; MORELL, 2003; TETLOW et al., 2004; STONE; MORELL, 2009; ZHANG et al., 2011). Todas estas isoformas das enzimas atuam juntas coordenadamente e formam uma rede de regulação para controlar a síntese de amido no endosperma de arroz que afetam tanto a produtividade quanto a qualidade do grão (JAMES et al., 2003; JEON et al., 2010; TIAN et al., 2010).

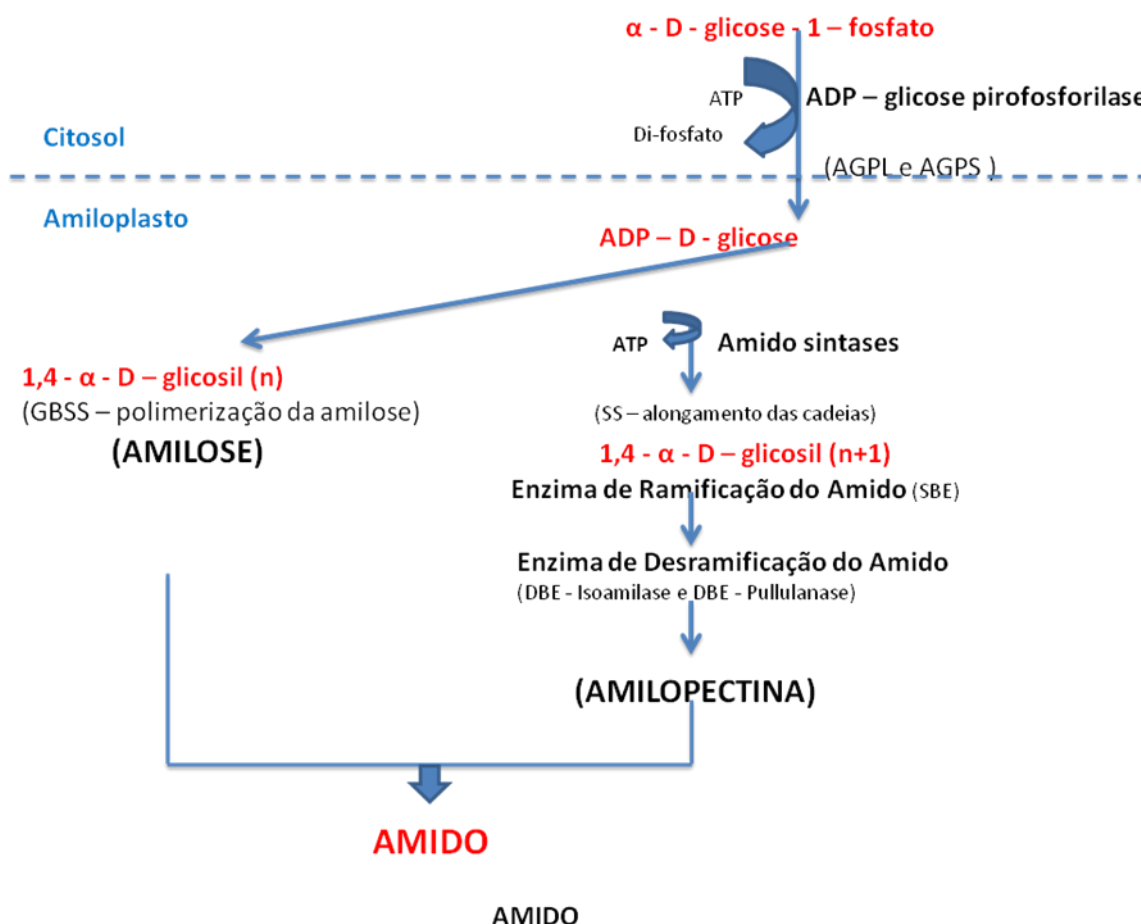


Figura 2. Metabolismo da síntese do Amido. CGF/FAEM/UFPel 2012.

2.8 Adenosina Difosfato glicose pirofosforilase

A ADP - glicose pirofosforilase (*Adenosine 5' Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase* - AGPase) é responsável pela primeira reação que controla o fluxo de carbono na via do amido nas plantas (SLATTERY et al., 2000; BALLICORA et al., 2004; KLECZKOWSKI et al., 2000). É responsável pela síntese do precursor ADP-glicose (ADP-D-glicose ou ADP-Glc) que age como um doador glicosil nas reações catalisadas pelas amido sintases. É uma enzima heterotetramérica composta por duas subunidades, uma subunidade maior reguladora (AGPL) e a outra menor catalítica (AGPS) (SMITH-WHITE; PREISS, 1992; PREISS; SIVAK, 1996; GREENE; HANNAH, 1998; LEE et al., 2007). No endosperma dos cereais é conhecida por estar presente principalmente no citosol, onde exerce maior atividade (65-95%), associado com uma menor fração plastidial, enquanto que nos tecidos de outros cereais e todos os tecidos de plantas não - cereais, é localizada apenas no

estroma plastidial (DENYER et al., 1996; BECKLES et al., 2001; HANNAH et al., 2001; JAMES et al., 2003). O arroz tem um total de seis genes que codificam para AGPase: dois para AGPS (*OsAGPS1* e *OsAGPS2*) e quatro para AGPL (*OsAGPL1*, *OsAGPL2*, *OsAGPL3* e *OsAGPL4*) (OHDAN et al., 2005) (ver Apêndice A).

O gene *OsAGPS2* aparentemente apresenta transcritos alternativos *OsAGPS2a* e *OsAGPS2b*, que diferem apenas no seu primeiro éxon, e/ou são processados a partir de um pré-mRNA comum, que sofrem um “*splicing*” alternativo ou são produzidas por diferentes sinalizações no promotor. O *OsAGPS2a* é um transcrito de 1.930pb, carrega uma sequência de um peptídeo de trânsito, provavelmente plastidial, enquanto que *OsAGPS2b* tem 1.749pb e não tem peptídeo de trânsito, tornando-se provavelmente, uma forma citosólica (OHDAN et al., 2005).

A julgar pela presença de peptídeos de trânsito e similaridades com AGPases correspondentes, de outras espécies, para as quais a localização tem sido caracterizada, *OsAGPS1*, *OsAGPS2a*, *OsAGPL1*, *OsAGPL3* e *OsAGPL4*, são considerados localizados em plastídios, enquanto que *OsAGPS2b* e *OsAGPL2*, estão presentes no citosol (BHAVE et al., 1990; HANNAH et al., 2001). Análise de mutantes *OsAGPS2* e *OsAGPL2* revelaram que a lesão de uma das duas isoformas citosólicas provocam uma notável redução na síntese de amido no endosperma do arroz.

2.9 Amido sintases

As amido sintases (SS) são encontradas associadas aos grânulos de amido nos plastídeos (GBSS – *Granule Bound Starch Synthase*) ou no estroma dos plastídeos (SSS – *Soluble Starch Synthase*). É geralmente aceito que as sintases do amido solúvel (SS) estão envolvidas na formação da amilopectina e as sintases ligadas ao grânulo de amido (GBSS) na polimerização da amilose (alongamento), embora a possibilidade de que GBSS desempenhe um papel na formação das cadeias longas de amilopectina não possa ser descartada (DELRUE et al., 1992; OHDAN et al., 2005).

As amido sintases catalisam a etapa da reação de alongação da cadeia α -1,4 na síntese do amido, transferindo uma unidade de glicose da ADP- glicose para terminação não - redutora da cadeia α -1,4 (TETLOW et al., 2004).

De todas as enzimas de biossíntese de amido, as SS possuem o maior número de isoformas. Em arroz existe uma família gênica onde vários locos codificam as diferentes isoformas da enzima, no total 10 isoformas de amido sintase foram descritas (NAKAMURA, 2002; HIROSE; TERAOKA, 2004; TETLOW et al, 2004, ZHANG et al, 2011): SSI (cromossomo 6), SSII-1 ou SSIIc (cromossomo 10), SSII-2 ou SSIIb (cromossomo 2), SSII-3 ou SSIIa (cromossomo 6), SSIII-1 ou SSIIIb (cromossomo 4), SSIII-2 ou SSIIIa (cromossomo 8), SSIV-1 ou SSIVa (cromossomo 1), SSIV-2 ou SSIVb (cromossomo 5), GBSSI/waxy (cromossomo 6) e GBSSII (cromossomo 7) (ver Apêndice A).

As SSI, SSIIa, SSIIIa e GBSSI são altamente expressos no desenvolvimento do endosperma (HIROSE; TERAOKA, 2004; OHDAN et al., 2005). As SSIIa e SSIIIa são as principais isoenzimas associadas com a biossíntese de amilopectina em cereais, como milho (GAO et al., 1998; CAO et al., 1999) e arroz ssp. *japonica* (FUJITA et al., 2006), e também em folhas de *Arabidopsis* (DELVALLE et al., 2005; ZHANG et al., 2005).

Em contraste, SSII e SSIII são as principais isoenzimas presentes em tubérculos de batata (MARSHALL et al., 1996; EDWARDS et al., 1999; LLOYD et al., 1999) e embriões de ervilha (CRAIG et al., 1998).

O papel de algumas destas enzimas na síntese de amido já é conhecido. Trabalhos recentes com mutantes afetando a atividade da enzima SSI resultaram em mudanças estruturais na amilopectina, levando ao aumento de temperatura de gelatinização do amido no endosperma. Tem sido sugerido, desta forma, que SSI está envolvida no controle da síntese de cadeia longa de amilopectina (NISHI et al., 2001).

SSII tem um papel específico na síntese de cadeias de amido de comprimento intermediário a longo (FONTAINE et al., 1993; CRAIG et al., 1998; EDWARDS et al., 1999; MORELL et al., 2003). Resultado de análises de mapeamento genético em arroz sugeriram o gene *SSIIa* (SSII) (localizados no loco *alk* no cromossomo 6), como responsável pelas diferenças na estrutura da amilopectina entre duas variedades de arroz, Nipponbare (*japonica*) e Kasalath (*indica*) (UMEMOTO et al., 2002).

A isoforma SSIII é responsável pela síntese de amilopectina da fração solúvel da amido síntase. A redução na atividade de SSIII parece não afetar o conteúdo de

amido ou amilose em relação à amilopectina, e sim a forma granular do amido (LI et al., 2003).

Por fim, as cadeias de amilopectina são sintetizados pelas ações coordenadas de SSI, SSIIa e SSIIIa, sendo que a atividade de SSI é descrita como sendo maior do que a das enzimas SSIIa e SSIIIa (FUJITA et al., 2006).

A enzima da amido sintase ligada ao grânulo de amido (GBSS – *Granule Bound Starch Synthases*) é a grande reponsável pela síntese de amilose nas cultivares de arroz, e é composta por duas isoformas (GBSSI e GBSSII).

A GBSSI é codificada pelo gene *Waxy* e está envolvida na síntese das cadeias longas de amilopectina (TAKEDA et al., 1987; WANG et al., 1995; DENYER et al., 1996; CAI et al., 1998; FU; XUE, 2010), em maior proporção, o que resulta na ausência de cadeias muito longas no arroz cerosos.

A expressão da enzima GBSSI parece estar limitado principalmente nos tecidos de armazenamento, enquanto a enzima GBSSII é codificada por um outro gene separado e é responsável pela síntese de amilose nas folhas (FUJITA; TAIRA, 1998; VRINTEN; NAKAMURA, 2000 ; CAI et al, 1998;. FU; XUE, 2010).

O *Waxy* (*Wx*) codifica a enzima UDP – *glucose transferase* do grão de amido (OKAGAKI, 1992; HIROSE; TERAOKA, 2004), e possui dois alelos funcionais, *Wx^a* e *Wx^b*, responsáveis por alto e baixo conteúdo de amilose, respectivamente (SANO et al., 1984). *Wx^a* é distribuído principalmente nas cultivares *indicas* de *O. sativa* L., *O. glaberrima* Steud. e seus progenitores silvestres, enquanto *Wx^b* é distribuído em variedades *japonicas* de *O. sativa* L. e está relacionado com baixo conteúdo da proteína *Wx* e de amilose no endosperma de arroz (HIRANO et al., 1998).

Análise molecular do loco *Waxy* indicou que a diferença de expressão dos alelos *Wx^a* e *Wx^b* é causada por uma substituição de base única, ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), que ocorre no sítio doador de processamento (*splice donor site*) do primeiro *íntron* do gene. O alelo *Wx^a* possui a sequência 5'-AGGTATA na junção do sítio de processamento do *íntron* 1, enquanto o alelo *Wx^b* possui a sequência 5'-AGITATA. A substituição de uma base nitrogenada contribui para o decréscimo da eficiência de processamento do pré-mRNA e diminui a quantidade de amilose nas cultivares homozigotas *Wx^b* (CAI et al., 1998; HIRANO et al., 1998; ISSIKI et al., 1998). A diminuição de amilose, portanto, afeta diretamente a qualidade do grão.

2.10 Enzimas ramificadoras

Após o alongamento das cadeias de glicose pelas enzimas SS, as enzimas ramificadoras do amido SBE (*Starch Branching Enzyme*), com suas duas isoformas, SBEI e SBEII catalisam a formação de ligações α -1,6, por meio da clivagem interna de ligações α -1,4, e transferem as ligações para as extremidades hidroxilas para que seja formada a estrutura da molécula ramificada da amilopectina, afetando a estrutura da mesma e dos grânulos do amido (SEO et al., 2002). Sendo assim estas enzimas ramificadoras do amido, são essenciais para síntese de amilopectina em tecidos de reserva das sementes (REPELLIN et al., 1997).

Algumas espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas possuem duas classes de enzimas de ramificação do amido, a SBEI, responsável por ramificações mais longas, e a SBEII, responsável por ramificações mais curtas. Estas também diferem entre si de acordo com a especificidade de seus substratos, modo de ação, distribuição temporal e papel fisiológico (TAKEDA et al., 1993; GUAN; PREISS, 1993; BURTON et al., 1995; NAIR et al., 1997; MORELL et al., 1997).

O arroz possui um único gene que codifica para BEI (*OsBEI*) e dois genes para BEII (*OsBEIIa* e *OsBEIIb*) (ver Apêndice A) também relacionados com a adição de ramificações mais curtas (BEIIa) ou mais longas (BEIIb). A supressão da enzima de ramificação do amido (SBEIIb) em ervilha, milho e arroz levam a detecção de mutantes com fenótipo com um teor de amilose muito alto (BHATTACHARYYA et al., 1990; STINARD et al., 1996; BUTARDO et al., 2011). Em contraste, a supressão de *SBEI* ou *SBEIIa* não tem efeito sobre a quantidade de amilose (BLAUTH et al., 2001; SATOH et al., 2003).

Em trigo os genes homólogos de *OsSBEIIa* e *OsSBEIIb*, tem sido caracterizados e foram encontrados localizados no braço longo do grupo homólogo do cromossomo 2 (NAIR et al., 1997; REGINA et al., 2005). O gene homólogo de *OsSBEIIa* em trigo é sintênico ao gene correspondente em outros cereais, em contraste, o gene *OsSBEIIb* não está em uma posição sintênica, *OsSBEIIa* é a isoforma predominante na fase solúvel do endosperma (REGINA et al., 2005), enquanto que no milho e no endosperma do arroz, *OsSBEIIb* é a isoforma predominante envolvida na biossíntese de amilopectina (YAMANOUCHI; NAKAMURA, 1992; GAO et al., 1997).

O loco *BEIIa* (que codifica isoforma *SBEIIa*) de arroz (também designado como *QEIIb* por YAMANOUCHI; NAKAMURA, 1992, e *SBE4* por MIZUNO et al., 1992) foi localizado no cromossomo 4 (UMEMOTO et al., 2002). Já *SBEIIb* do arroz, designado também como *QEIIa* (YAMANOUCHI; NAKAMURA, 1992) ou *SBE3* (MIZUNO et al., 1992), foi mapeado no cromossomo 2 (HARRINGTON et al., 1997).

Ainda em relação as duas isoformas de *SBEII* (*OsSBEIIa* e *OsSBEIIb*) (VANDEPUTTE; DELCOUR, 2004), em arroz, *OsSBEIIa* é preferencialmente expresso nas folhas, embora tem sido relatado a expressão deste em todos os tipos de tecidos, enquanto *OsSBEIIb* é expresso especificadamente no endosperma dos grãos (YAMANOUCHI; NAKAMURA, 1992; MIZUNO et al., 1993; OHDAN et al., 2005; YAMAKAWA et al., 2007).

O gene *OsSBEIIb* é classicamente conhecido em arroz como *ae* (*amylose extender*). Este loco que é responsável pelo aumento de amilopectina no endosperma (NISHI et al., 2001). O gene *OsSBEIIb* também afeta a expressão da enzima SSI, responsável pela síntese das cadeias longas de amilopectina.

2.11 Enzimas desramificadoras

As DBE (*Debranching enzyme*) são enzimas desramificadoras do amido e desempenham um papel na síntese da amilopectina (NAKAMURA et al., 1997; KUBO et al., 1999).

As plantas superiores possuem duas famílias de DBE atuando na hidrólise de ligações α -1,6, a ISA (Isoamilase) e a PUL (Pullulanase), que diferem nas propriedades, como na especificidade do substrato (LEE; WHELAN, 1971; NAKAMURA, 1996; BEATTY et al., 1999; FUJITA et al., 1999; HUSSAIN et al., 2003). O arroz possui três genes (*OsISA1*, *OsISA2* e *OsISA3*), que codificam três diferentes isoformas da enzima DBE - isoamilase (KUBO et al., 2005) e um único gene (*OsPUL*) que codifica a enzima DBE - pullulanase (NAKAMURA et al., 1996) (ver Apêndice A). O loco *DBE* – isoamilase tem possivelmente papel na síntese de amilopectina, eliminando as ramificações impróprias das cadeias (α -1,6) de amilopectina no arroz (NAKAMURA et al., 2002).

Várias investigações revelaram que as mutações no loco *ISA* de milho (*sugary1* ou *su1*; JAMES et al., 1995; RAHMAN et al., 1998; DINGES et al., 2001), arroz (*sugary1* ou *su1*; NAKAMURA et al., 1996, KUBO et al., 1999), *sta7* em

Chlamydomonas (MOUILLE et al., 1996, DAUVILLÉE et al., 2001), *dbe1* em *Arabidopsis* (ZEEMANET, et al., 1998) e *notch2* em cevada (BURTON et al., 2002) causam mudanças drásticas na estrutura da amilopectina de forma aleatória e com uma estrutura altamente ramificada de α -1,6/ α -1,4-glucanas, cujo fenótipo é caracterizado pela redução no conteúdo de amido.

Há relatos para quase tudo, que a atividade dos genes *Os/SA1* e *Os/SA2* é totalmente em endosperma de arroz, enquanto que o gene *Os/SA3* é expresso principalmente na folha (FUJITA, et al., 1999; KUBO, et al., 1999, 2005). Ainda, estudos anteriores sugerem que o perfil de expressão do gene *OsPUL* em sementes foi altamente significativo em relação a folha em plantas de arroz (OHDAN et al., 2005, LI et al., 2009), principalmente em estágios de preenchimento e maturação do grão (DUAN; SUN, 2005).

2.12 Melhoramento genético visando a qualidade industrial do arroz

Com o início da prática do melhoramento genético de plantas houve um aumento acentuado na produtividade agrícola. Isto é consequência da grande necessidade de uma fonte adequada de alimentação para satisfazer o constante crescimento populacional e com área de cultivo cada vez mais limitada.

Sendo assim, o melhoramento genético de arroz tem por objetivo o constante desenvolvimento de novas variedades, mais produtivas, de melhor qualidade de grãos, com alto rendimento industrial, tolerância a moléstias para atender às demandas da indústria com variedades que satisfaçam os padrões de consumo.

Um importante entrave para a agroindústria do arroz, principalmente para as médias e pequenas indústrias, é a dificuldade de se obter matéria-prima com constância e qualidade, ou seja, a matéria-prima que garanta o funcionamento da indústria durante o ano todo (FERREIRA; YOKOYAMA, 1999).

O estabelecimento de padrões de qualidade de arroz baseados em propriedades físicas e químicas dos grãos, criam a necessidade do desenvolvimento de estratégias específicas de melhoramento que poderão ser auxiliadas pela incorporação da seleção assistida por marcadores moleculares.

A qualidade de grãos, foco deste trabalho, desempenha um papel fundamental na adoção das novas cultivares de arroz, dada a estreita relação entre

a produção, a indústria e o consumidor. Portanto, a melhoria na qualidade do amido no endosperma de arroz, especialmente para aumentar o nível de amilose, é extremamente importante para que nos programas de melhoramento, sejam selecionadas novas cultivares de qualidade, alto rendimento industrial e aceitação dos padrões culinários de consumo do Brasil.

2.13 Referências

- AYABE, S.; KASAI, M.; OHISHI, K.; HATAE, K. Textural properties and structures of starches from *indica* and *japonica* rice with similar amylose content. **Food Science and Technology Research**, v.15, n.3, p.299-306, 2009.
- BALL, S.G.; MORELL, M.K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p. 207–233, 2003.
- BALLICORA, M.A.; IGLESIAS, A.A.; PREISS, J. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch biosynthesis. **Photosynthesis Research**, v.79, p. 1-24, 2004.
- BEATTY, M.K.; RAHMAN, A.; CAO, H.; WOODMAN, W.; LEE, M.; MYERS, A.M.; JAMES, M.G. Purification and molecular genetics characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. **Plant Physiology**, v.119, p.255–266, 1999.
- BECKLES, D.M.; SMITH, A.M.; REES, T. A cytosolic ADPglucose pyrophosphorylase is a feature of graminaceous endosperms, but not of other starch-storing organs. **Plant Physiology**, v.125, p.818–827, 2001.
- BEHALL, K.M.; SCHOLFIELD, D.J., Food amylose content affects postprandial glucose and insulin responses. **Cereal Chemistry**, v.82, p.654-659, 2005.
- BHATTACHARYYA, M.K.; SMITH, A.M.; NOEL ELLIS, T.H.; HEDLEY, C.; MARTIN, C. The wrinkled-seed character of pea described by mendel is caused by transposon-like insertion in a gene encoding starch- branching enzyme. **The Plant Cell**, v.60, p.115-122, 1990.
- BHAVE, M.R.; LAWRENCE, S.; BARTON, C.; HANNAH, L.C. Identification and molecular characterization of shrunken-2 cDNA clones of maize. **The Plant Cell**, v.2, p.581–588, 1990.
- BLAUTH, S.L., YUAN, Y., KLUCINEC, J.D., SHANNON, J.C., THOMPSON, D., GUILITINAN, M. Identification of mutator insertional mutants of starchbranching enzyme 2a in corn. **Plant Physiology**. v.125, p.1396–1405. 2001.

- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.
- BURTON, R.A.; BEWLEY, J.D.; SMITH, A.M.; BHATTACHARYYA, M.K.; TATGE, H.; RING, S.; BULL, V.; HAMILTON, W.D.O.; MARTIN, C. Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. **Plant Journal**, v.7, p.3-15, 1995.
- BURTON, R.A.; JENNER, H.; CARRANGIS, L.; FAHY, B.; FINCHER, G.B.; HYLTON, C.; LAURIE, D.A.; PARKER, M.; WAITE, D.; VAN WEGEN, S. Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. **Plant Journal**, v.31, p. 97–112, 2002.
- BUTARDO, V.M.; FITZGERALD, M.A.; BIRD, A.R. Impact of downregulation of starch branching enzyme IIb in rice by artificial microRNA and hairpin RNA mediated RNA silencing. **Journal of Experimental Botany** (in press), 2011.
- CAI, X.L.; WANG, Z.Y.; XING, Y.Y.; ZHANG, J.L.; HONG, M.M. Aberrant splicing of *intron 1* leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content. **Plant Journal**, v.14, p.459–465, 1998.
- CAO, H.; IMPARL-RADOSEVICH, J.; GUAN, H.; KEELING, P.L.; JAMES, M.G.; MYERS, A.M. Identification of the soluble starch synthase activities of maize endosperm. **Plant Physiology**, v.120, p.205–215, 1999.
- CASTRO, E. M. et al. **Qualidade de grãos em arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, (Embrapa Arroz e Feijão, Circular Técnica, n. 34). 1999.
- COFFMAN, W.R.; JULIANO, B.O. Rice. In: Olson, R.A.; Frey, K.J. Nutritional quality of cereal grains: Genetic and agronomic improvement. **American Society of Agronomy, Madison**, cap.5, p.101-131. 1987.
- COLLEONI, C.; DAUVILLE´E, D.; MOUILLE, G. Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. **Plant Physiology**, v.120, p.993–1003, 1999.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 06 de junho de 2012.
- CRAIG, J.; LLOYD, J.R.; TOMLINSON, K.; BARBER, L.; EDWARDS, A.; WANG, T.L.; MARTIN, C.; HEDLEY, C.L.; SMITH, A.M. Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. **The Plant Cell**, v.10, p.413–426, 1998.
- DAUVILLE, D.; COLLEONI, C.; MOUILLE, G.; BULEON, A.; GALLANT, D.J.; BOUCHET, B.; MORELL, M.K.; D'HULST, C.; MYERS, A.M.; BALL, S.G. Two loci control phytoglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, v.125, p.1710-1722, 2001.

DELRUE, B.; FONTAINE, T.; ROUTIER, F.; DECQ, A.; WIERUSZESKI, J.M.; VAN, D.E.N.; KOORNHUYSE, N.; MDDELEIN, M.L.; FOURNET, B.; BALL, S. Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutant defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase accumulate a structurally modified amylopectin. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.3612-3620, 1992.

DELVALLE, D.; DUMEZ, S.; WATTEBLED, F.; ROLDA, N. I.; PLANCHOT, V.; BERBEZY, P.; COLONNA, P.; VYAS, D.; CHATTERJEE, M.; BALL, S.; MERIDA, A.; D'HULST, C. Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. **The Plant Journal**, v. 43, p. 398–412, 2005.

DENYER, K.; DUNLAP, F.; THORBJØRNSSEN, T.; KEELING, P.; SMITH, A.M. The major form of ADP-Glc pyrophosphorylase in maize endosperm is extra plastidial. **Plant Physiology**, v.112, p.779–785, 1996.

DINGES, J.R.; COLLEONI, C.; MYERS, A.M.; JAMES, M.G. Molecular structure of three mutations at the maize sugary 1 locus and their allele-specific phenotypic effects. **Plant Physiology**, v.125, p. 1406–1418, 2001.

DUAN, M.J.; SUN, S.S.M. Profiling the expression of genes controlling rice grain quality. **Plant Molecular Biology**, v.59, p.165–178. 2005.

EDWARDS, A.; FULTON, D.C.; HYLTON, C.M.; JOBLING, S.A.; GIDLEY, M.; ROSSNER, U.; MARTIN, C.; SMITH, A.M. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. **The Plant Journal**, v.17, p. 251–261, 1999.

EMBRAPA CPACT, **Embrapa Clima Temperado**. www.cpact.embrapa.br. 2012.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical databases**. Disponível em: <http://www.fao.org>. 2012.

FAO/WHO. **Carbohydrates in human nutrition**. Roma. 1997.

FERREIRA, C. M.; YOKOYAMA, L. P. **Cadeia Produtiva do Arroz na Região Centro - Oeste**. Brasília, Embrapa Produção de Informação, 1999. 110p.

FERREIRA, C.M. et al. **Qualidade do arroz no Brasil: evolução e padronização**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. 61p.

FONTAINE, T.; D'HULST, C.; MADDELEIN, M.L.; ROUTIER, F.; PEPIN, T.M.; DECQ, A.; WIERUSZESKI, J.M.; DELRUE, B.; VAN DEN KOORNHUYSE, N.; BOSSU, J.P. Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p.16223–16230, 1993.

- FREI, M. et al. Studies on in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v.83, p.395-402, 2003.
- FU, F.F.; XUE, H.W. Co-expression analysis identified rice starch regulator 1a Rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator1. **Plant Physiology**, v.154, p.927-938. 2010.
- FUJITA, N.; KUBO, A.; FRANCISCO, P.B. JR.; NAKAKITA, M.; HARADA, K.; MINAKA, N.; NAKAMURA, Y. Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. **Planta**, v.208, p.283–293. 1999.
- FUJITA, N.; TAIRA, T. A 56-kDa protein is a novel granule-bound starch synthase existing in the pericarps, aleurone layers, and embryos of immature seed in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). **Planta**, v.207, p.125-132. 1998.
- FUJITA, N.; YOSHIDA, M.; ASAKURA, N.; OHDAN, T.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; NAKAMURA, Y. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. **Plant Physiology**, v.140, p.1070–1084, 2006.
- GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v.32, n. 3, p.177-191, 1997.
- GAO, M.; FISHER, D.K.; KIM, K.N.; SHANNON, J.C.; GUILTINAN, M.J. Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb. Isolation and characterization of a Sbe2a cDNA. **Plant. Physiology**, 114, 69-78, 1997.
- GOFF, S.A. et al.; A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, v.296, n. 5565, p. 92-100, 2002.
- GREENE, T.W.; HANNAH, L.C. Maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase SHRUNKEN2 and BTITTLE2 subunit interactions. **The Plant Cell**, v.10, p.1295–1306, 1998.
- GUAN, H.P.; PREISS, J. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). **Plant Physiology**, v.102, p.1269-1273, 1993.
- HANNAH, L.C.; SHAW, J.R.; GIROUX, M.J.; REYSS, A.; PRIOUL, J.L.; BAE, J.M.; LEE, J.Y. Maize genes encoding the small subunit of ADPglucose pyrophosphorylase. **Plant Physiology**, v.127, p.173–183, 2001.
- HARRINGTON, S.E.; BLIGH, H.F.J.; PARK, W.D.; JONES, C.A.; MCCOUCH S.R. Linkage mapping of starch branching enzyme III in rice (*Oryza sativa* L.) and prediction of location of orthologous genes in other grasses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.564–568, 1997
- HIGGINS, J.A.; HIGBEE, D.R.; DONAHOO, W.T.; BROWN, I.L.; BELL, M.L.; BESSESEN, D.H. Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. **Nutrition and Metabolism**, v.1, n.8. 2004.

HIRANO, H.Y.; EIGUCHI, M.; SANO, Y. A single base change altered the regulation of the Waxy gene at the posttranscriptional level during the domestication of rice. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, p.978–987, 1998.

HIROSE, T.; TERAOKA, T. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v.220, p.9–16, 2004.

HIZUKURI, S.; ABE, J.I.; HANASHIRO, I. **Starch: analytical aspects. In Carbohydrates in Food**, 2 ed. Boca Raton: CRC Press, Florida, 2006. p. 305–390.

HUNT, J.R.; JOHNSON, L.K.; JULIANO, B.O. Bioavailability of zinc from cooked Philippine milled, undermilled, and brown rice, as assessed in rats by using growth, bone zinc, and zinc-65 retention. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n.18, p. 5229-5235, 2002.

HUSSAIN, H.; MANT, A.; SEALE, R.; ZEEMAN, S.; HINCHLIFFE, E.; EDWARDS, A.; HYLTON, C.; BORNEMANN, S.; SMITH, A.M.; MARTIN, C., Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. **The Plant Cell**, v.15, p.133–149, 2003.

IRGSP, International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, p. 793-800, 2005.

IRRI – **International Rice Research Institute – Rice Basics**. Disponível em: <http://irri.org/about-rice/rice-facts/rice-basics>. 2012.

ISSHIKI, M.; MORINO, K.; NAKAJIMA, M.; OKAGAKI, R.J.; WESSLER, S.R.; IZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 50 splice site of the first *intron*. **Plant Journal**, v.15, p.133–138, 1998.

JAMES, M.G.; DENYER, K.; MYERS, A.M. Starch synthesis in the cereal endosperm. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.215–222, 2003.

JAMES, M.G.; ROBERTSON, D.S.; MYERS, A.M. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. **The Plant Cell**, v.7, p.417–429, 1995.

JEON, J-S.; RYOO, N.; HAHN, T-R.; WALIA, H.; NAKAMURA, Y. Starch biosynthesis in cereal endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.383-392. 2010.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.210–218, 2004.

JULIANO, B. O.; BECHTEL, D. B. The rice grain and its gross composition Rice: chemistry and technology. **American Association of Cereal Chemists**, Minnesota, Cap. 2, 1985. p.17-57.

KLECZKOWSKI, L.A. Is leaf ADP-glucose pyrophosphorylase an allosteric enzyme? **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1476, p. 103–108, 2000.

KOIDE, T. et al. Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v.11, n.4, p.273-277, 1996.

KUBO, A.; FUJITA, N.; HARADA, K.; MATSUDA, T.; SATOH, H.; NAKAMURA, Y. The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. **Plant Physiology**, v.121, p.399–410, 1999.

KUBO, A.; RAHMAN, S.; UTSUMI, Y.; LI, Z.; MUKAI, Y.; YAMAMOTO, M.; UGAKI, M.; HARADA, K.; SATOH, H.; KONIK-ROSE, C.; MORELL, M.; NAKAMURA, Y. Complementation of *sugary-1* phenotype in rice endosperm with the wheat Isoamylase1 gene supports a direct role for Isoamylase in amylopectin biosynthesis. **Plant Physiology**, v.137, p.43-56, 2005.

LANG, N. T.; BUU, B. C. Quantitative analysis on amylase content by DNA markers through backcross populations of rice (*Oryza sativa* L.). **Omon rice Research Institut**, v.12, p.13–18, 2004.

LEE, E.Y.C.; WHELAN, W.J. Glycogen and starch-debranching enzymes. **The Enzymes**, New York, v. 5, p.191– 234, 1971.

LEE, S.K.; HWANG, S.K.; HAN, M.; EOM, J.S.; KANG, H.G.; HAN, Y, et al. Identification of the ADPglucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice. **Plant Molecular Biology**, v.65, p.531-546. 2007.

LI, Z.; SUN, F.; XU, S.; CHU, X. The structural organisation of the gene encoding class II starch synthase of wheat and barley and the evolution of the genes encoding starch synthases in plants. **Functional and Integrative Genomics**, v.3, p.76–85, 2003.

LIU, Q. Starch Modifications and Applications. In: CUI, S. W (Ed.). **Food Carbohydrates: Chemistry**, Physical Properties, and Applications, CRC Press, cap. 8. 2005. p. 357-406.

LLOYD, J.R.; LANDSCHUTZE, V.; KOSSMANN, J. Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin. **Biochemical Journal**, v.338, p.515–521, 1999.

MARSHALL, J.; SIDEBOTTOM, C.; DEBET, M.; MARTIN, C.; SMITH, A.M. Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. **The Plant Cell**, v.8, p.1121–1135, 1996.

MILLER, J. B. et al. Rice: a high or low glycemic index food? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.1034-1036, 1992.

MIZAUNO, K.; KAWASAKI, T.; SHIMADA, H.; SATOH, H., KOBAYASHI, E.; OKUMURA, S.; ARAI, Y.; BABA, T. Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, p. 19084–19091, 1993.

MORELL, M.K.; BIENNOW, A.; KOSAR-HASHEMI, B.; SAMUEL, M.S. Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. **Plant Physiology**, v.113, p.201- 208, 1997.

MORELL, M.K.; MYERS, A.M. Towards the rational design of cereal starches. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.204–210, 2005.

MORELL, M.K.; KOSAR-HASHEMI, B.; CMIEL, M.; SAMUEL, M.S.; CHANDLER, P.; RAHMAN, S.; BULEON, A.; BATEY, I.L.; LI, Z. Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. **The Plant Journal**, v.34, p.173–185, 2003.

MYERS, A.M.; MORELL, M.K.; JAMES, M.G.; BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v. 122, p. 989-997, 2000.

NAIR, R.B.; BAGA, M.; SCOLES, G.J.; KARTHA, K.K.; CHIBBAR, R.N. Isolation, characterization and expression analysis of a starch branching enzyme II cDNA from wheat. **Plant Science**, v.122, p.153-163, 1997.

NAKAMURA, Y. Some properties of starch debranching enzymes and their possible role in amylopectin biosynthesis. **Plant Science**, v.121, p.1–18, 1996.

NAKAMURA, Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. **Plant and Cell Physiology**, v.43, p.718–725, 2002.

NISHI, A.; NAKAMURA, Y.; TANAKA, N.; SATOH, H. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. **Plant Physiology**, 127, 459–472, 2001.

OHDAN, T.; FRANCISCO, P.B.; SAWADA, T.; HIROSE, T.; TERAOKA, T.; SATOH, H.; NAKAMURA, Y. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.3229–3244, 2005.

OKAGAKI, R.J. Nucleotide sequence of a long cDNA from the rice *waxy* gene. **Plant Molecular Biology**, v.19, p. 513–516, 1992.

ONG, M.H.; BLANSHARD, J.M.V. Texture determinants in cooked, parboiled rice I: rice starch amylose and the fine structure of amylopectin. **Journal of Cereal Science**, v.21, p.251- 260, 1995.

PEREIRA, J.A. **O arroz-vermelho cultivado no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2004. 90 p.

PEREIRA, J.A.; BASSINELLO, P.Z.; FONSECA, J.R.; RIBEIRO, V.Q. Potencial genético de rendimento e propriedades culinárias do arroz-vermelho cultivado. **Revista Caatinga**, v.20, p.43-48, 2007.

PREISS, J.; SIVAK, M. **Starch synthesis in sinks and sources**. In: Zamski E, Schaffer AA, (eds.) Photoassimilate distribution in plants and crops: source–sink relationships. New York, Marcel Dekker, 1996. p.139–168.

PURI, R.P.; SIDDIQ, E.A.; MEHRA, R.B. Studies on cooking and nutritive qualities of cultivated Rice *Oryza sativa* L. II Quantitative genetic characterization of amylase content. **Genética Agrária**, v.34, p.15-34, 1980.

QURESHI, A. A. et al. Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic humans. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.8, p.290-298, 1997.

RAHMAN, S.; ABRAHAMS, S.; ABBOTT, D.; MUKAI, Y.; SAMUEL, M.; MORELL, M.; APPELS, R. A complex arrangement of genes at a starch branching enzyme I locus in the D-genome donor of wheat. **Genome**, v.40, p.465–474, 1997.

REGINA, A.; KOSAR-HASHEMI, B.; LI, Z.Y.; PEDLER, A.; MUKAI, Y.; YAMAMOTO, M.; GALE, K.; SHARP, P.; MORELL, M.K.; RAHMAN, S. Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-syntenic locus. **Planta**, v.222, p.899–909, 2005.

REPELLIN, A.; NAIR, B.R.; BAGA, M.; CHIBBAR, N.R. Isolation of a Starch Branching Enzyme I cDNA from a Wheat Endosperm library. **Plant Physiology**, v.114, p.1135, 1997.

RONG, N. et al. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. **Lipids**, v.32, n.3, p.303-309, 1997.

SANO, Y. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.68, p.467–473, 1984.

SATOH, H., NISHI, A., FUJITA, N., KUBO, A., NAKAMURA, Y., KAWASAKI, T. AND OKITA, T.W. Isolation and characterization of starch mutants in rice. **Journal of Applied Glycoscience**. v.50, p.225–230. 2003.

SEO, B.S.; KIM, S.; SCOTT, P.M.; SINGLETARY, G.W.; WONG, K.S.; JAMES, M.G.; MYERS, A.M. Functional interactions between heterologously expressed starch-branching enzymes of maize and the glycogen synthases of brewer's yeast. **Plant Physiology**, v.128, 1189-1199, 2002.

SLATERY, C.J.; KAVAKLI, H.; OKITA, T.W. Engineering starch for increased quantity and quality. **Trends in Plant Science**, v.5, n.7, p.291-298, 2000.

SMITH, A.M.; DENYER, K.; MARTIN, C. The synthesis of the starch granule. **Annual Review. Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 67-87, 1997.

SMITH-WHITE, B.J.; PREISS, J. Comparison of proteins of ADP – glucose pyrophosphorylase from diverse sources. **Journal of Molecular Evolution**, v.34, p.449–464, 1992.

STINARD, P.S.; ROBERTSON, D.S.; SCHNABLE, P.S. Genetic isolation cloning and analysis of a Mutator-induced dominant animorph of the maize amylase extender1 locus. **Plant Cell**, v.5, p.1555-1556, 1993.

STONE, B.; MORELL, M.K. CARBOHYDRATES. IN: KHAN, K., SHEWRY, P.R. (Eds.) **Wheat: Chemistry and Technology**. St. Paul: AACC, 2009. p. 299–362.

TAKEDA, Y.; HIZUKARI, S.; JULIANO, B.O. Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. **Carbohydrate Research**, v.168, p.79-88. 1987.

TAKEDA, Y.; GUAN, H.P.; PREISS, J. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. **Carbohydrate Research**, v.240, p.253-263, 1993.

TECHAWIPHARAT, J.; SUPHANTHARIKA, M.; BEMILLER, J.N. Effects of cellulose derivatives and carrageenans on the pasting, paste, and gel properties of rice starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 3, p. 417-426, 2008.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J. **Polysaccharides. II. Polysaccharides from eukaryotes**. In: Vandamme EJ, De Baets S, Steinbuchel A, eds. Starch in biopolymers, Weinheim: Wiley-VCH, v.6. p.381–438. 2002.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.151–165, 2004.

TETLOW, I.J.; DAVIES, E.J.; VARDY, K.A.; BOWSHER, C.G.; BURRELL, M.M.; EMES, M.J. Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p.715–725, 2003.

TIAN, Z.; QIAN, Q.; LIU, Q.; YAN, M.; LIU, X.; YAN, C, et al. Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.106, p.21760-21765. 2010.

UMEMOTO, T.; YANO, M.; SATOH, H.; SHOMURA, A.; NAKAMURA, Y. Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1-8, 2002.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; B. VAN DER VEEN, J.C.M.; UITDEHAAG, H.; LEEMHUIS, L. DIJKHUIZEN, Properties and applications of starch converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, p. 137-155, 2002.

VANDEPUTTE, G.E., DELCOUR, J.A. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p.245–266. 2004.

VRINTEN, P.; NAKAMURA, T. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. **Plant Physiology**, v.122, p.255-263. 2000.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p.1184-1192, 2008.

WANG, Z.Y.; ZHENG, F.Q.; SHEN, G.Z.; GAO, J.P.; SUNSTAD, D.P. LI, M.G. et al. The amylose content in rice endosperm is revealed to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. **Plant Journal**, v.7, p.613-622.1995.

WYATT, C. J.; TRIANA-TEJAS, A. Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca, and phytates in foods commonly consumed in northern Mexico. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, p. 2204-2209, 1994.

XIA, M. et al. Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice. **Journal of Nutrition**, v.133, n.3, p.744-751, 2003.

YAMAKAWA, H.; HIROSE, T.; KURODA, M.; YAMAGUCHI, T. Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. **Plant Physiology**, v.144, p.258–277, 2007.

YAMANOUCHI, H.; NAKAMURA, Y. Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme (Q-enzyme) in rice. **Plant and Cell Physiology**, v.33, p.985–991, 1992.

YU, J. et al., A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, v.296, n. 5565, p. 79-92, 2002.

ZEEMANET, S.C.; UMEMOTO, T.; LUE, W.L.; AU-YEUNG, P.; MARTIN, C.; SMITH, A.M.; CHEN, J. A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. **Plant Cell**, v.10, p.1669-1711, 1998.

ZHANG, X.; MYERS, A.M.; JAMES, M.G. Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. **Plant Physiology**, v.138, p.663–674, 2005.

ZHANG, G.; CHENG, Z.; ZHANG, X.; GUO, X.; SU, N.; JIANG, L.; et al. Double repression of soluble starch synthase genes *SSIIa* and *SSIIIa* in rice (*O. sativa* L.) uncovers interactive effects on physic-chemical properties of starch. **Genome**, v.54, p.448-459. 2011.

3. CAPÍTULO II

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NO METABOLISMO DO AMIDO EM GENÓTIPOS DE ARROZ COM DIFERENÇAS NA QUALIDADE DE GRÃOS

3.1 Introdução

O arroz é considerado um dos principais alimentos básicos, pois é fonte de energia para mais da metade da população mundial. O arroz é composto em 90% por amido. O amido é um componente importante da dieta humana, este é o produto final da fotossíntese em tecidos fonte e é armazenado como reserva de energia nos tecidos dreno. As propriedades do amido determinam as principais características funcionais e culinárias do arroz, como a temperatura de cozimento, e influenciam a saúde humana através de sua contribuição para redução do índice glicêmico (KHARABIAN-MASOULEH et al., 2012). O amido possui dois componentes principais, que consistem em duas formas de polímeros de glicose: a amilose composta por ligações glicosídicas α -1,4 formando cadeias lineares e a amilopectina composta por cadeias lineares com ligações α -1,4 ligadas por pontes α -1,6 formando cadeias ramificadas.

A qualidade industrial é geralmente afetada pela coesão e maciez e poderia ser representada pelo teor de amilose (TA), consistência do gel (CG), temperatura de gelatinização (TG) e teor de proteína do arroz (JULIANO et al., 1965; BETT-GARBER et al., 2001). O TA está relacionado com a aparência e textura do arroz afetando significativamente a qualidade do grão. A CG é responsável pela suavidade do arroz, enquanto que a TG é uma característica física responsável pelo tempo de cocção e a capacidade de absorver água quando cozinhar (SUN et al., 2006).

Um fator chave na determinação do TA do arroz é o gene *Waxy*, que é um loco da amido sintase ligado ao grânulo do amido ("*GBSS*") (NELSON; PAN, 1995). Diferentes alelos *GBSS* característicos de cultivares *indica* e *japonica* estão

associadas com diferenças no teor de amilose, e mutantes nulos de GBSS produzem arroz glutinoso, sem amilose (SMITH et al., 1997). As reações de alongamento das cadeias α -1,4 de amilose e amilopectina são distintamente catalisadas pela GBSS e amido sintase (SS), respectivamente. A amilopectina tem uma estrutura muito mais definida chamada de “*tandem – cluster structure*”, porque ela é composta por agrupamentos ligados em sequência (aproximadamente 9-10nm de comprimento cada uma) (THOMPSON, 2000). A estrutura distinta da amilopectina contribui para a organização cristalina do grânulo de amido (GALLANT et al., 1997). A variação na estrutura fina do agrupamento é considerada por provocar variações nas propriedades funcionais do amido entre espécies e tecidos.

E estudos recentes mostraram que as principais famílias proteicas que catalisam as reações de biossíntese do amido, influenciando de alguma forma nas propriedades sensoriais do arroz, contribuindo direta ou indiretamente para a produção de grânulos de amido, são: AGPase, SS, SBE e DBE. A enzima ADP – glicose pirofosforilase (AGPase) catalisa a produção do substrato comum (ADP-glicose), para a síntese da amilose e da amilopectina, mesmo sendo estas sintetizadas por vias diferentes. As enzimas ramificadoras do amido (SBE) atuam na ramificação das cadeias de glicose, as enzimas desramificadoras do amido (DBE) atuam na linearização das cadeias de glicose e as amido sintases (SS), destas a amido sintase ligada ao grânulo do amido (GBSS – amido sintase insolúvel), controla a síntese de amilose no endosperma do arroz, enquanto que a amido sintase solúvel (SS), juntamente com as SBE e DBE atua no controle da síntese da amilopectina. Algumas destas enzimas possuem múltiplas isoformas, codificadas por diferentes locos da família gênica localizados em cromossomos distintos, sendo que cada loco desempenha um papel distinto na biossíntese do amido (SMITH et al., 1997; COLLEONI et al., 1999; MYERS et al., 2000; NAKAMURA, 2002; BALL; MORELL, 2003; TETLOW et al., 2004; STONE; MORELL, 2009; ZHANG et al., 2011). Todas estas isoformas das enzimas atuam juntas coordenadamente e formam uma rede de regulação para controlar a síntese de amido no endosperma de arroz que afeta a qualidade de grão (JAMES et al., 2003; JEON et al., 2010; TIAN et al., 2010).

Portanto, a análise dos padrões de expressão destes genes é importante para compreender suas características em tecidos específicos e em estágios específicos do desenvolvimento e da biossíntese do amido.

Em plantas de arroz, tendo em vista que as muitas pesquisas realizadas com estes genes são em genótipos da subespécie *japonica*, muitos mecanismos envolvidos no metabolismo do amido em arroz, da subespécie *indica*, ainda precisam ser detalhadamente elucidados.

Considerando a necessidade e a importância dos estudos referentes a qualidade de grãos em arroz, este trabalho teve como objetivo analisar o perfil de expressão dos genes *OsSSI*, *OsSSIIIa*, *OsSIVb*, *OsBEI*, *OsBEIIb*, *OsGBSSI*, *OsAGPS2b*, *OsAGPL2*, *OsGPT1*, *OsISA1*, *OsISA2*, *OsISA3* e *OsPUL* envolvidos na síntese do amido, em genótipos de arroz contrastantes quanto ao conteúdo de amilose no grão, visando a elucidação dos mecanismos envolvidos na biossíntese do amido.

3.2 Material e Métodos

Genótipos

O experimento foi realizado nas instalações do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF), pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), e na Embrapa Clima Temperado (ETB), Capão do Leão – RS, Brasil.

Foram utilizados no trabalho três genótipos de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.), um pertencente à subespécie *indica* (BRS Pampa) que possui alto conteúdo de amilose, outro à subespécie *japonica tropical* (BRS Firmeza) com conteúdo intermediário de amilose e um a subespécie *japonica* (Nipponbare) com baixo teor de amilose, oriundos da coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado.

Para o estabelecimento do experimento, as sementes utilizadas passaram por processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, após foram lavadas três vezes em água, para posterior acondicionamento em rolos de papel germinador, umedecido com água ultrapura. Posteriormente foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por uma semana, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Plântulas uniformes foram transplantadas para baldes em casa - de - vegetação onde permaneceram até a coleta das panículas. Foram realizadas coletas

nos tempos: cinco dias após o florescimento (DAF); 10 DAF, 15 DAF, 20 DAF, 25 DAF e 30 DAF.

Após cada uma das coletas, as panículas das plantas foram imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido e posteriormente, armazenadas a - 80°C até a extração do RNA. O delineamento experimental adotado foi completamente casualizado.

Análises de Expressão Gênica - Extração de RNA

Inicialmente foi realizado o tratamento de todas as vidrarias, cadinhos, pistilos e demais utensílios necessários com água contendo 0,01% de dietilpirocarbonato (H₂O DEPC), para evitar a ação de enzimas que degradam o RNA (RNases). A pureza e a integridade do RNA total extraído foram mensuradas através de análises de absorbância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 2001).

O RNA total foi extraído dos grãos das panículas. As extrações foram realizadas em triplicatas, as panículas foram maceradas em N₂ líquido e transferidas para tubos eppendorf de 1,5 µL contendo 500µL de reagente *Pure Link Plant RNA* (Invitrogen). A mistura foi homogeneizada em aparelho tipo *vortex* e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. O homogenato foi, então, centrifugado a 12.000 rpm (18.500 x g), por 15 minutos, em temperatura ambiente (Eppendorf 5810R, Rotor F 45-30-11, USA). O sobrenadante foi transferido para um novo “*eppendorf*” ao qual foram adicionados 100µL de NaCl 5M e 300µL de clorofórmio gelado a fim de promover a solubilização dos lipídeos. Na sequência os tubos sofreram inversão manual por 15 segundos e após foram centrifugados a 12.000 rpm (18.500 x g) por 10 minutos a 4°C. Posteriormente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado igual volume de isopropanol gelado. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos. Novamente foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de etanol 75% a 4°C e centrifugado a 12.000 rpm (18.500 x g) por 3 minutos a 4°C.

O RNA precipitado permaneceu em temperatura ambiente até a eliminação do excesso de álcool. Posteriormente, o mesmo foi ressuspendido em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, GIBCO BRL) e armazenado a 4°C até o dia seguinte, quando foi avaliado em gel de agarose 1% corado com brometo de

etídeo quanto a sua integridade para posterior quantificação por espectrofotometria (espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1800), com base na relação da absorbância A260nm/A280nm.

Síntese de cDNA fita simples

Para a síntese do cDNA, as amostras de RNA foram digeridas com DNase I (Invitrogen™) para eliminação de contaminação com DNA genômico. Os cDNAs fita simples foram obtidos a partir de 2µg de RNA total, utilizando o kit *SuperScript™III First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen™), de acordo com os seguintes passos: em um tubo livre de RNases adicionou-se o volume previamente calculado de RNA total para uma concentração de 2 µg, 1,0 µL DNaseI (1 µL⁻¹), 1,0 µL de DNase I *reaction buffer* 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl], completando para um volume total de 10 µl com H₂O, submeteu-se essa reação a 25°C por 15 minutos. Adicionou-se mais 1,0 µL de EDTA (25 mM; pH 8,0) submetendo-se a 65°C por 10 minutos. Posteriormente colocou-se 1,0 µL de *Oligo DT* (50 µM), 1,0 µL de *DNTP Mix* (10 mM) e submeteu-se a 65°C por 5 minutos, seguido de 1 minutos a 0°C. Adicionou-se então 4,0 µL de *RT Buffer* 5x, 4,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de DTT (1,4-Dithiothreitol) (0,1 M), 1,0 µL de *RNase OUT™* (40 U.µL⁻¹) e 1,0 µL de *SuperScript™ III* (200 U.µL⁻¹) submetendo-se a 50°C por 50 minutos, seguido de mais 5 minutos a 85°C. Por fim adicionou-se 1,0 µL de *RNase H* (2 U.µl⁻¹) submetendo-se a 37°C por 20 minutos, completando a reação de síntese de cDNA. A qualidade dos cDNAs foi avaliada através de uma reação de amplificação com o gene constitutivo da *Ubiquitina*.

qRT-PCR em tempo real

Foram analisados os níveis de expressão dos principais genes pertencentes às famílias gênicas envolvidas na biossíntese do amido, altamente expressos no endosperma do grão de arroz (Tabela 1) em seis tempos de coleta das panículas: 5DAF; 10DAF, 15 DAF, 20 DAF, 25 DAF e 30 DAF. Os dados de expressão dos genes “alvo” foram normalizados em relação ao nível de expressão do gene constitutivo da Ubiquitina (*UBQ5*), utilizado como padrão de referência (gene endógeno) (JAIN et al., 2006).

As curvas de eficiência de amplificação para cada par de “*primers*” dos genes estudados e para o gene constitutivo foram obtidas a partir de uma série de diluições do cDNA (1:1; 1:5; 1:25; 1:125). Também foram geradas curvas de dissociação para verificar a especificidade dos *primers*. Essas curvas padrão foram representadas através de um gráfico de regressão linear do valor Ct em comparação ao log das diluições de cDNA, apresentando um valor denominado de *slope*. O *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: log da concentração das amostras x Ct (*Threshold Cycle*). O Ct é o ponto onde a curva de amplificação tem fase de crescimento com ângulo igual ou próximo a 45 graus entre as coordenadas x e y, ou seja ciclo da PCR vs. fluorescência dos *amplicons*, neste ponto a curva é cortada por uma linha (*Threshold*). Quando diferentes amostras fazem parte de uma placa em análise, o programa do computador estima um único *Threshold* e este serve para estimar o CT (*Threshold Cycle*) para cada amostra. O valor CT é utilizado tanto para cálculos da eficiência dos *primers* quanto para estimar as diferenças na quantidade de transcritos em diferentes amostras.

A eficiência de cada conjunto de *primers* para utilizar em reações de qRT-PCR foi determinado através do cálculo utilizando a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ descrita por Rasmussen (2001). O valor da eficiência deve ser próximo a 100% ($100\% \pm 10\%$) e deve ser semelhante entre controle endógeno e gene alvo. O valor de R^2 (coeficiente de determinação), também é gerado a partir da curva padrão e indica o quanto os valores Ct sobrepõem os pontos da reta obtida pelos valores log das diluições. Quanto mais parecidas estiverem as replicas sobre a reta melhor será a eficiência do *primer*.

Após o cálculo das eficiências de amplificação individuais dos genes alvo e endógeno foi construído um gráfico representativo da validação experimental (dados não apresentados). No eixo X foram colocados os valores de log da concentração das amostras e no eixo Y a diferença entre a média do Ct do gene de interesse e a média do Ct do controle endógeno ($\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$), normalizando a amplificação do gene alvo em função do gene endógeno. O valor da inclinação da curva deve ficar entre -0,1 e 0,1 (Applied Biosystems /suporte@appliedbiosystems.com).

Para quantificação em tempo real foi utilizado 12,5 µl do kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 µl da primeira fita de cDNA (diluída 1:25, selecionada com base nos resultados das

análises de validação) e 8,5 µl água para completar o volume final de 25 µl. As amostras foram acondicionadas em placas (96 Well Optic Plates - Applied Biosystems®) e cobertas com adesivo óptico (Optic Adhesives - Applied Biosystems®).

As reações foram realizadas no termociclador ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems). Foram utilizadas três repetições biológicas e três repetições técnicas. As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: Desnaturação inicial (95°C, durante 10 minutos); 40 ciclos (Desnaturação 95°C, durante 15 segundos; Anelamento 60°C, durante 1 minutos; Extensão 72°C, durante 1 minuto), ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo. Por último, a extensão final de 72°C por 5 minutos. A quantificação relativa de cada gene foi feita utilizando o método do *Ciclo Threshold (CT)* comparativo, como descrito por Livak e Schmittgen (2001). A razão da expressão relativa (R) do gene alvo foi calculada com base na eficiência (E) e no ΔC_t (C_t do controle - C_t da amostra analisada), tendo os dados de expressão do gene alvo normalizados em relação ao nível de expressão de gene de referência (endógeno) (PFAFFL, 2001).

$$R = \frac{(E_{alvo})^{(CT_{controle} - CT_{tratamento})}}{(E_{endogeno})^{(CT_{controle} - CT_{tratamento})}}$$

E_{alvo} = eficiência do *primer* do gene alvo

$E_{ref.}$ = eficiência do *primer* do gene de referência

Figura 1. Cálculo referente à eficiência do *primer* utilizado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

Análise estatística

Foi realizada análise de variância e análise de comparação de médias para os genes estudados, no programa SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002). Os dados também foram analisados através de ferramentas do programa Mult Experiment Viewer (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003), EASE Expression Analysis Systematic Explorer versão 4.6 de acordo com Hosack et al. (2003) e Sigmaplot versão 10.0, e posteriormente apresentados em forma de gráficos e diagramas de cores.

Tabela 1. Informações referentes aos genes e suas sequências de nucleotídeos utilizados nas análises de expressão dos genes em qRT-PCR. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

Enzima	Nº Acesso	Nome do gene	Chr.	F/R	Sequência dos <i>Primers</i> (5' – 3')	Sinônimos (referências)
ADP-Glicose Pirofosforilase	AK071497	<i>OsAGPL2</i>	1	F R	CGGGACCGTCATATAAAAGCA TCCCATTCCAAAACAAACCA	<i>OsAGPL2</i> (Takashi et al. 2005)
ADP-Glicose Pirofosforilase (subunidade pequena)	AK103906	<i>OsAGPS2b</i>	8	F R	AACAATCGAAGCGCGAGAAA GCCTGTAGTTGGCACCCAGA	Shurunken (Kawagoe et al. 2005), <i>OsAPS2</i> (Takashi et al. 2005)
Amido Sintase (solúvel)	AK109458	<i>OsSSI</i>	6	F R	GGGCCTTCATGGATCAACC CCGCTTCAAGCATCCTCATC	SSIII-2 (Dian et al. 2005, Hirose and Terao 2004) SSIV-2 (Dian et al. 2005, Hirose and Terao 2004)
	AK061604	<i>OsSSIIIa</i>	8	F R	GCCTGCCCTGGACTACATTG GCAAACATATGTACACGGTTCTGG	
	AK067577	<i>OsSSIVb</i>	5	F R	TTTCAGCTGGGCCTCTTCAG TGCAGATGAAGCCATGTTCG	
Amido Sintase (ligado ao grânulo)	AK070431	<i>OsGBSSI</i>	6	F R	AACGTGGCTGCTCCTTGAA TTGGCAATAAGCCACACACA	Waxy (Okagaki 1992)
Enzimas de Ramificação	AK065121	<i>OsBEI</i>	6	F R	TGGCCATGGAAGAGTTGGC CAGAAGCAACTGCTCCACC	RBE3 (Mizuno et al. 1993)
	AK066446	<i>OsBEIIb</i>	2	F R	ATGCTAGAGTTTGACCGC AGTGTGATGGATCCTGCC	Amylose-extender (Nishi et al., 2001)
Glicose 6-Fosfato/Fosfato translocador	AK060577	<i>OsGPTI</i>	8	F R	AGAAGGGATCCAGATGAAGAATG GAACAAGAAACGAGCAACATAGACC	
Enzima de Desramificação: Isoamilase	AB015615	<i>OsISA1</i>	8	F R	TGCTCAGCTACTCCTCCATCATC AGGACCGCACAACTTCAACATA	Sugary-1 (Kubo et al., 1999)
	AK288307	<i>OsISA2</i>	5	F R	TAGAGGTCTCTTGAGG AATCAGCTTCTGAGTCACCG	
	AK101554	<i>OsISA3</i>	9	F R	AGCTTGAGACACTGGGTTGAG GCATCAAGAGGACAACCATCTG	
Enzima de Desramificação: Pullulanase Ubiquitina	AK242137	<i>OsPUL</i>	4	F	ACCTTTCTTCCATGCTGG	(JAIN et al., 2006)
	AK061988	<i>OsUBQ5</i>	1	F R	ACCACTTCGACCGCCACTACT ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	

* Chr - cromossomo

3.3 Resultados e Discussão

Os resultados do experimento referente a validação dos oligonucleotídeos (*primers*) são apresentados na Tabela 2. A qualidade da curva padrão foi aferida a partir do *slope* da equação de regressão, utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação, assim como do coeficiente de determinação (R^2) (DEPREZ et al., 2002).

As eficiências mais ajustadas, entre 1,9 e 2,2, foram evidenciadas para os genes *OsUBQ5* (2,1), *OsISA1* (2,0), *OsISA2* (2,1), *OsPUL* (2,0) e *OsSSIVb* (2,0), *OsGPT1*, *OsGBSSI* (2,2), *OsBEIb* (2,2), *OsAGPL2* (2,2) e *OsSSI* (2,2). No entanto, os genes, *OsISA3* (2,4), *OsSSIIIa* (2,3) e *OsAGPS2b* (2,5), obtiveram valores de eficiência fora dos valores recomendados, indicando possíveis problemas na qualidade dos *primers* (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados do experimento de validação dos genes *OsSSI*, *OsSSIIIa*, *OsSIVb*, *OsBEI*, *OsBEIb*, *OsGBSSI*, *OsAGPS2b*, *OsAGPL2*, *OsGPT1*, *OsISA1*, *OsISA2*, *OsISA3* e *OsPUL* em relação ao padrão de referência *OsUBQ*, realizada a partir de diluições seriadas de cDNA dos genótipos BRS Pampa, BRS Firmeza e Nipponbare durante os tempos de coleta. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

Gene	Slope	Eficiência	Eficiência %	R^2
<i>OsUBQ5</i>	-3,063	2,1	112	0,988
<i>OsPUL</i>	-3,432	2,0	96	0,966
<i>OsSSIVb</i>	-3,357	2,0	99	0,967
<i>OsGPT1</i>	-2,963	2,2	118	0,992
<i>OsGBSSI</i>	-2,903	2,2	121	0,970
<i>OsISA1</i>	-3,267	2,0	102	0,954
<i>OsISA2</i>	-3,109	2,1	110	0,977
<i>OsBEIb</i>	-2,917	2,2	120	0,971
<i>OsAGPL2</i>	-2,848	2,2	124	0,991
<i>OsSSI</i>	-2,821	2,2	126	0,994
<i>OsISA3</i>	-2,546	2,4*	147	0,966
<i>OsSSIIIa</i>	-2,798	2,3*	128	0,963
<i>OsAGPS2b</i>	-2,517	2,5*	150	0,960
<i>OsBEI</i>	-3,719	1,9	86	0,752**

* eficiência inferior e/ou superior ao recomendado; ** coeficiente de determinação inferior e/ou superior ao recomendado.

Em relação aos valores dos coeficientes de determinação (R^2), estes foram todos superiores a 95% para a maioria dos genes, com exceção do *OsBEI* que

apresentou um valor de 75%, indicando que os resultados obtidos, com exceção do *OsBEI*, apresentaram confiabilidade. Coeficientes de determinação superiores a 95% indicam que a quantidade de *amplicons* que cada *primer* produz nas diferentes diluições do cDNA sofre redução conforme a redução da concentração inicial de cDNA (diluições).

A partir destes resultados obtidos no experimento de validação realizado para os genes, foi possível identificar quais apresentaram os valores mais ajustados, para que pudessem ser utilizados na análise de quantificação relativa. Sendo assim, foi realizado o experimento para os genes: *OsSSI*, *OsISA1*, *OsISA2*, *OsSSIVb*, *OsGPT1*, *OsGBSSI*, *OsBEIIb*, *OsAGPL2*, *OsUBQ5* e *OsPUL*.

Para a análise dos resultados, foram utilizadas amostras dos grãos das panículas das plantas de arroz, e o nível de expressão dos genes. Foram analisados em relação às panículas coletadas 5 dias após o florescimento (DAF), pois é nesta fase que a acumulação do amido no endosperma se torna evidente, ou seja, a matéria seca total dos grãos começa a aumentar e o amido no endosperma começa a acumular (SATO, 1984; HIROSE; TERAQ, 2004; OHDAN et al., 2005). Por definição o nível de expressão destas amostras foi igualado a um e as demais foram comparadas a elas.

Nas Figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7, podem ser observadas os gráficos referentes às alterações nos níveis de transcrições dos genes envolvidos na síntese do amido durante o enchimento dos grãos de arroz, a partir dos 10 DAF, que é quando o amido do endosperma e do grão seco pode aumentar rapidamente, até 30 DAF, ou seja, na maturação fisiológica, que é quando ambos, amido do endosperma e peso de grãos, continuam a aumentar, então os valores máximos são atingidos e tornam-se constantes. Os perfis de expressão ao longo do ciclo de desenvolvimento de enchimento dos grãos para cada classe de genes são descritos abaixo.

AGPase: A AGPase é a enzima que realiza a primeira etapa, ou seja, gera o primeiro precursor glicosil para a biossíntese de amido em cereais, ela é heterotetramérica e constituída por duas subunidades, uma pequena (AGPS) e outra grande (AGPL), com a maior parte (90%) da sua atividade, no citosol e o restante (10%) associadas com o amiloplasto (SLATTERY et al., 2000; SIKKA et al., 2001). Há indícios que a subunidade grande é principalmente regulatória, enquanto a subunidade pequena é catalítica (FU et al., 1998). Todavia, a julgar pela presença

de peptídeos de trânsito e homologias de sequências com AGPases correspondentes de outras espécies para as quais a localização tem sido caracterizada, *OsAGPS1*, *OsAGPS2a*, *OsAGPL1*, *OsAGPL3* e *OsAGPL4*, são considerados como pertencentes aos plastídios, enquanto que *OsAGPS2b* e *OsAGPL2*, ao citosol (BHAVE et al., 1990; HANNAH et al., 2001). Em razão disso, a identidade e os detalhes dos genes que codificam as duas subunidades no citosol e no amiloplasto não foram completamente trabalhados (BURTON et al., 2002).

A isoforma citosólica (*OsAGPL2*), estudada neste trabalho, é descrita por estar sendo preferencialmente expressa no endosperma de arroz, onde desempenha um papel importante no acúmulo de amido via síntese de ADP-glicose (OHDAN et al., 2005; HIROSE et al., 2006).

Os resultados obtidos indicam níveis de transcritos relativamente baixos para a cultivar com baixo teor de amilose (Nipponbare). Para a cultivar com alto teor de amilose (BRS Pampa), a expressão do gene *OsAGPL2* aumentou em 1,5 vezes aos 20 DAF, ocorrendo um decréscimo aos 25 DAF (0,9x) e 30 DAF (0,14x) (Figuras 2 e 7). Já para a cultivar com conteúdo intermediário de amilose (BRS Firmeza) o perfil de expressão deste gene foi alterado, sofrendo um aumento considerável ao longo do ciclo de desenvolvimento dos grãos, apresentando um pico entre os 15 DAF (16,8x) e 20 DAF (62,7x), posteriormente ocorreu um decréscimo aos 25 DAF (10,6x) e novamente um leve aumento no final do ciclo, aos 30 DAF (16,1x). Este aumento de expressão no final do ciclo, provavelmente, se deve ao fato desta cultivar BRS FIRMEZA apresentar um fenótipo “*stay-green*” (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2003), caracterizado por prolongar por um extenso período a coloração verde nas folhas, podendo assim surgir atrasos no início e no progresso da senescência (RAMPINO et al., 2006). Sendo assim, este alto nível de expressão na maturação pode estar associada ao fato desta cultivar ter que manter seu metabolismo ativo no final do ciclo em função deste caráter “*stay-green*” que a planta apresenta.

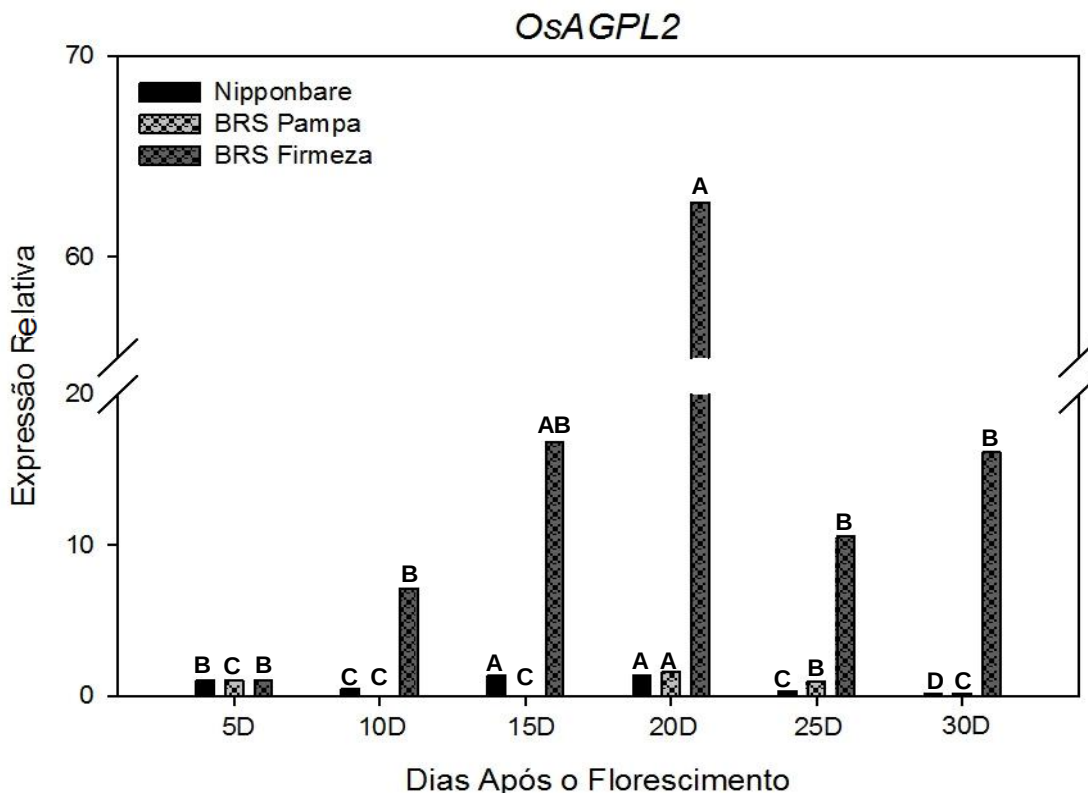


Figura 2. Gráfico com o perfil de expressão do gene *OsAGPL2*, envolvido na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

SS e GBSS: Em relação aos níveis de expressão do gene *OsSSI* (Figuras 3A e 7), sofreram aumento na cultivar BRS Firmeza a partir do início do enchimento do grão, ocorrendo um pico aos 20 DAF (14x), após ocorreu um decréscimo até o final do ciclo, onde o nível de expressão não chegou a 2x, já para as outras cultivares BRS Pampa e Nipponbare não houve uma mudança considerável no perfil deste gene.

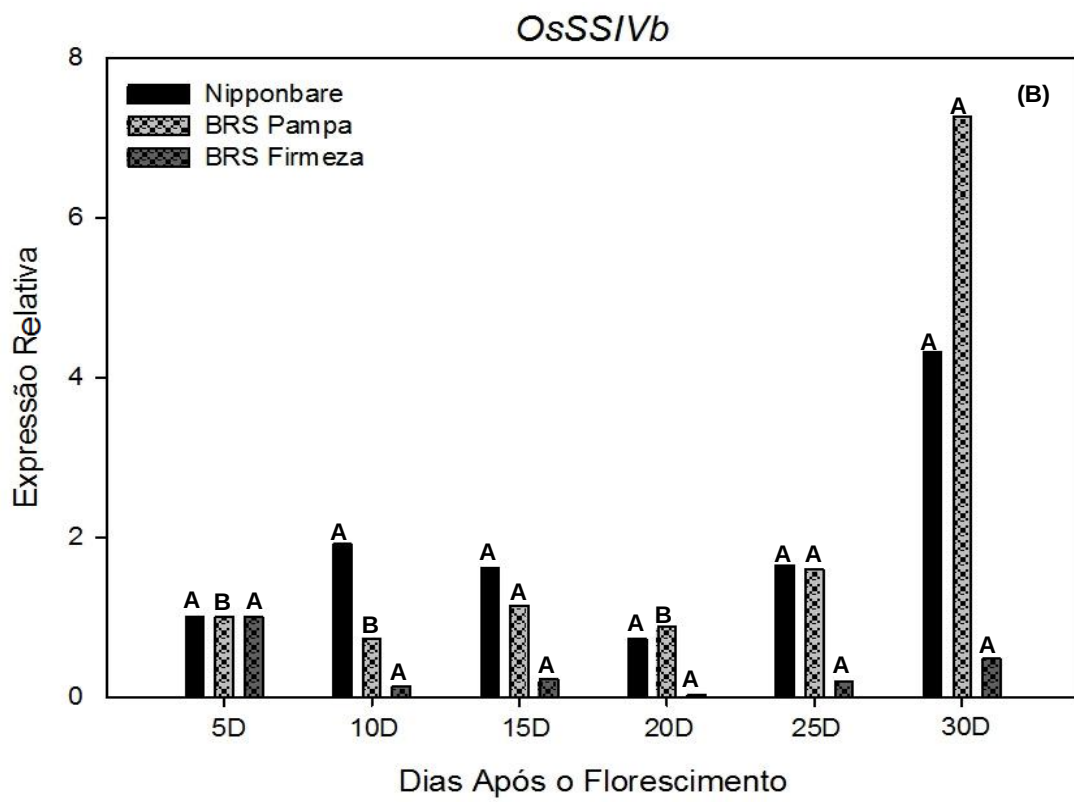
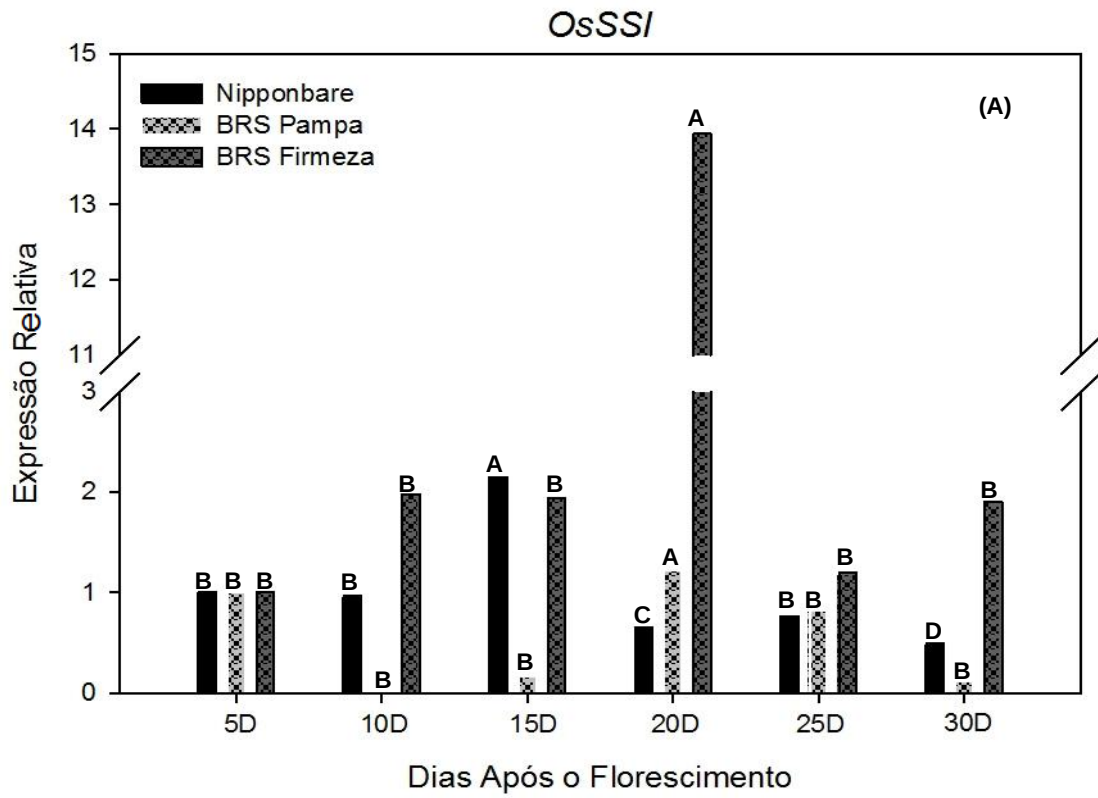
Resultados anteriores definiram que dentre os genes que codificam para as SS (amido sintases), o gene *SSI* é conhecido por explicar as principais atividades das SS no endosperma de cereais (CAO et al., 1999). Outros estudos ainda propuseram que *SSI* é principalmente envolvido na síntese (alongamento) das cadeias curtas, durante a síntese do “cluster” da amilopectina (DELVALLE et al., 2005). Sendo assim, sugere-se que este gene seja importante em todas as fases do desenvolvimento do grão (OHDAN et al., 2005) desempenhando um importante papel na biossíntese do amido em plantas. Sua deficiência poderia induzir uma alteração direta na estrutura dos grânulos de amido uma vez que não possui

múltiplas isoformas, ao contrário de todos os outros tipos SS com mais de duas isoformas do arroz (SSIIa, SSIIb, SSIIc, SSIIIa, SSIIIb, SSIVa, SSIVb, GBSSI e GBSSII).

Além de *SSI*, expressões significativas dos genes *SSIIa*, *SSIIc*, *SSIIIa*, *SSIVb*, e *GBSSI* foram observados no endosperma (COMMURI; KEELING, 2001; HIROSE; TERAOKA, 2004; OHDAN et al., 2005; FUJITA et al., 2006).

O perfil de expressão do gene *OsSSIVb* (Figuras 3B e 7) também foi analisado neste estudo e pode-se observar um comportamento altamente variável, para as cultivares estudadas. Para BRS Firmeza foi baixo e constante durante todo o período de enchimento dos grãos, para a cultivar BRS Pampa foi possível observar um aumento aos 30 DAF em torno de três vezes no número de transcritos. Já para a cultivar Nipponbare o aumento no número de transcritos para este gene foi gradual e constante, chegando aos 30 DAF num aumento de 3,7 vezes, corroborando com resultados anteriores que mostram que este gene (*SSIVb*) é expresso ao nível máximo no estágio tardio de desenvolvimento do endosperma em arroz da subespécie *japonica* (DIAN, JIANG; WU, 2005).

A GBSS (forma ligada ao grânulo do amido) codificada pelo gene *Waxy* (*Wx*) é a principal responsável pela síntese das cadeias lineares de moléculas de glicose encontradas na amilose, em órgãos de armazenamento de amido e é a enzima mais bem caracterizada na síntese de amido de cereais (SMITH et al., 1997; BALL; MORELL, 2003; KHARABIAN-MASOULEH et al., 2012). Neste trabalho, quando analisado o seu nível de expressão (Figuras 3C e 7), foi possível observar que houve um aumento aos 10 DAF (5x) na cultivar BRS Firmeza, sendo que foi possível identificar um pico de expressão aos 15 DAF, onde o gene aumentou consideravelmente em 176 vezes o número de transcritos. Já para as cultivares Nipponbare e BRS Firmeza o aumento no nível de expressão deste gene foi em torno de 5 vezes aos 20 e 25 DAF, sofrendo um declínio posteriormente, sendo que na cultivar Nipponbare a amplitude dos valores de vezes que o gene aumentou o seu número de transcritos foi menor (2x) quando comparado com a cultivar BRS Firmeza.



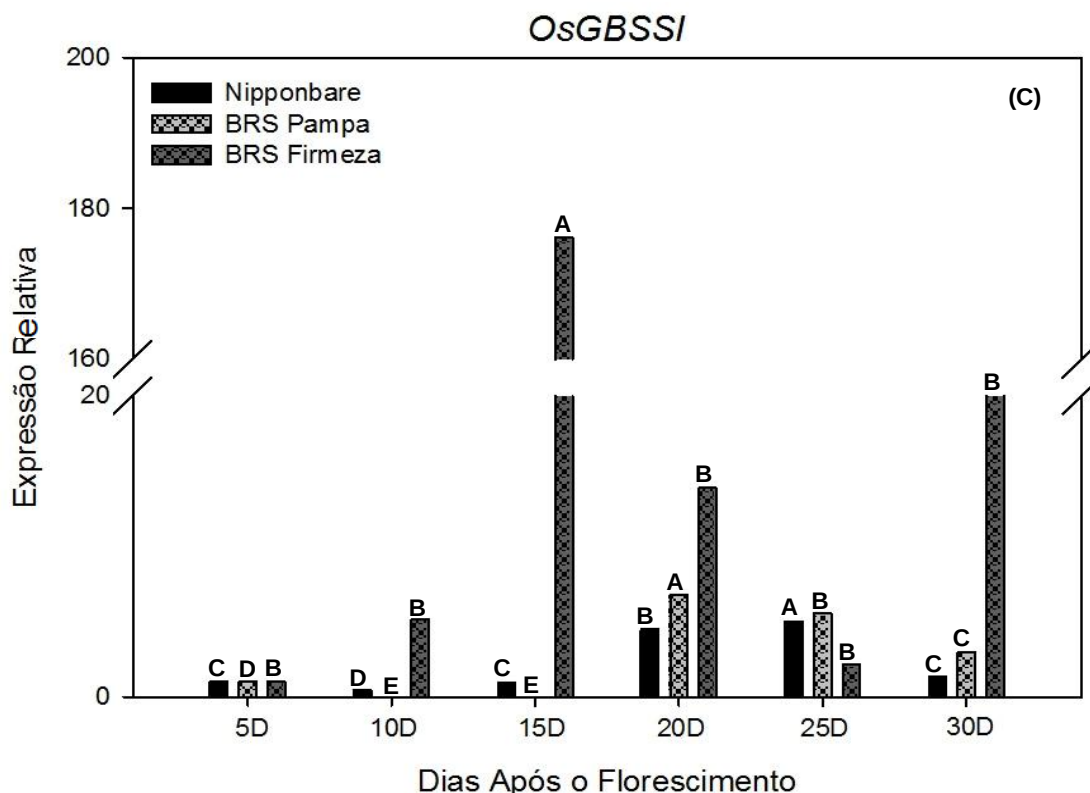


Figura 3. Gráfico com os perfis de expressão dos genes *OsSSI* (A), *OsSSIV* (B) e *OsGBSSI* (C), envolvidos na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

SBE: As SBE (enzimas ramificadoras do amido), possuem papel importante na síntese da amilopectina, introduzindo as ligações glicosídicas α -1,6 (MYERS et al., 2000; NAKAMURA, 2002). Após o alongamento das cadeias pelas enzimas SS, as enzimas SBE com duas isoformas (SBEI e SBEII) geram ligações α -1,6 por meio de clivagens internas de α -1,4, para formar a estrutura da molécula ramificada da amilopectina. As proteínas SBEII transferem cadeias mais curtas e apresentam uma maior afinidade com amilopectina, em comparação com as SBEI, que mostram as taxas mais elevadas de ramificação com amilose adicionando ramificações mais curtas (GUAN; PREISS, 1993; TAKEDA et al., 1993; TANAKA et al., 2004; TETLOW et al., 2004; TETLOW, 2006; NAKAMURA et al., 2010). Estas alterações estruturais na amilopectina aumentam e/ou diminuem a temperatura de gelatinização do amido no endosperma. Ainda SBEIIb é classicamente conhecido em arroz como *ae* (*amylose extender*) devido ao alelo presente identificado neste loco que é responsável pelo aumento da proporção de amilopectina no endosperma (NISHI et

al., 2001). Em arroz os genes *OSBEI* e *OsBEIIb*, que codificam para essas enzimas são preferencialmente expressos no endosperma (HIROSE et al., 2006).

O gene analisado neste trabalho (*OsBEIIb*) (Figuras 4 e 7) quanto ao nível de expressão nas diferentes cultivares estudadas, apresentou um aumento na expressão aos 20 DAF nas três cultivares. Para a cultivar Nipponbare, com baixo teor de amilose, a expressão deste gene foi bem menor em relação às demais cultivares, em contraste com resultados obtidos anteriormente por outros autores, onde foi relatado que a inibição da expressão destes genes (*OsSBEI* e *OsSBEIIb*) em arroz, estaria relacionadas com o aumento do teor de amilose no grão (ZHU et al., 2012).

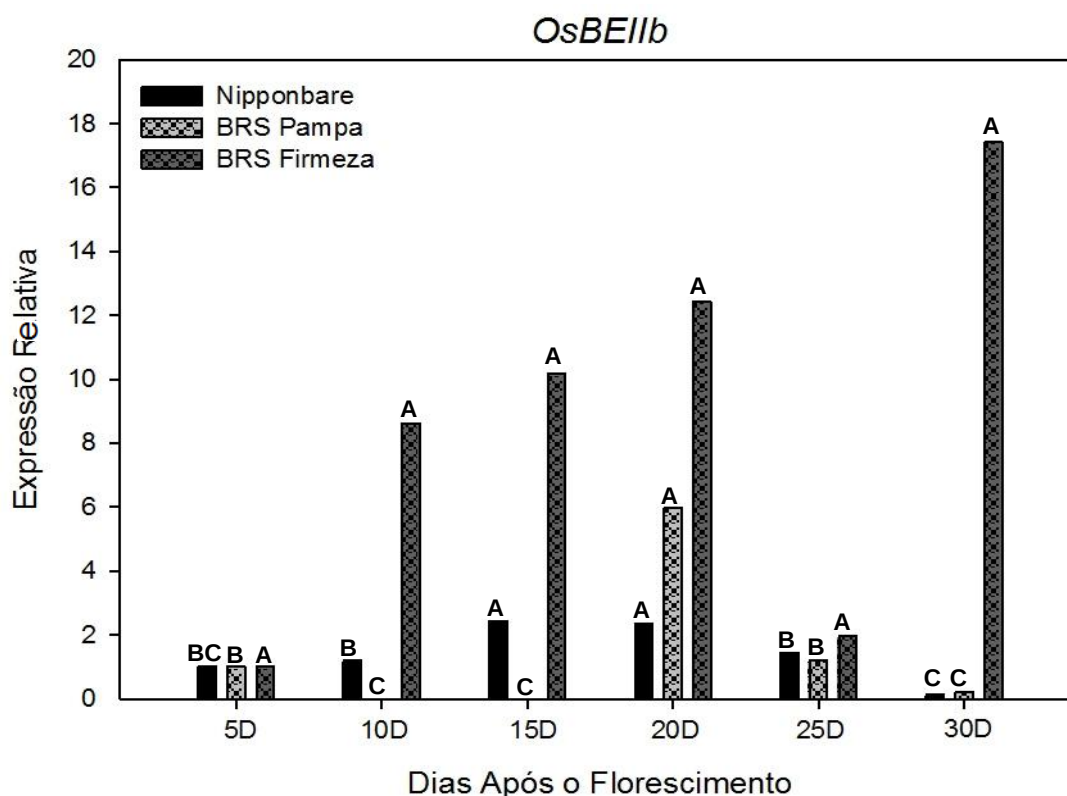


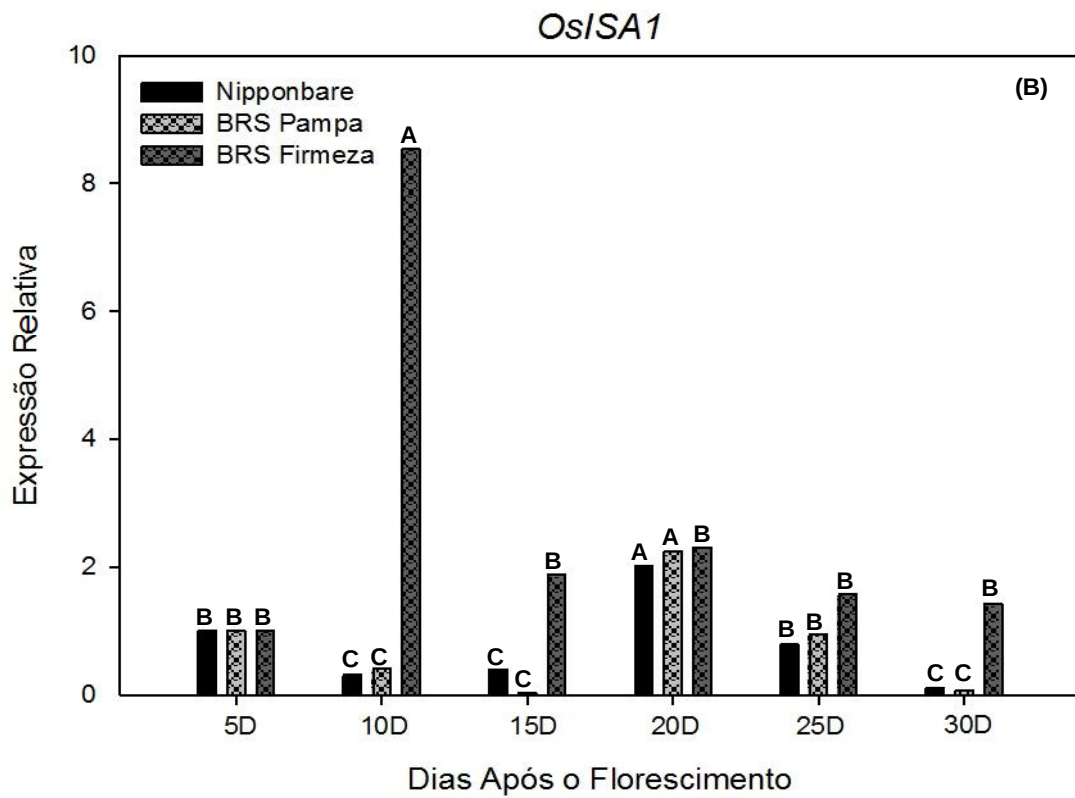
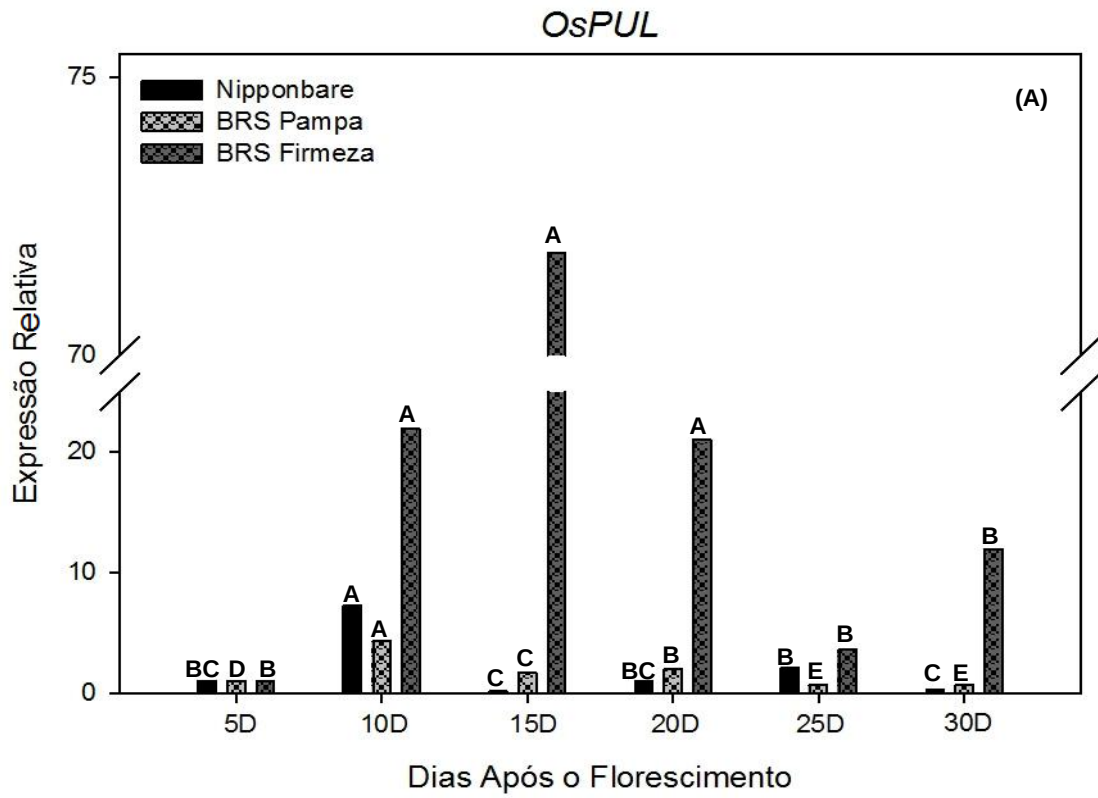
Figura 4. Gráfico com o perfil de expressão do gene *OsBEIIb*, envolvido na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

DBE (ISA e PUL): As enzimas desramificadoras do amido também participam do metabolismo do amido e possuem duas classes, que foram conservadas nas plantas, atuando na hidrólise de ligações α -1,6, as Isoamilases e as Pululanases (BEATTY et al., 1999). Estudos sugerem que os genes *OsISA1* e *OsISA2* em arroz,

são altamente expressos no endosperma enquanto *Os/SA3* é expresso principalmente na folha (KUBO et al., 2005). Ainda, em alguns trabalhos foi possível identificar que o perfil de expressão do gene *OsPUL* nos grãos foi altamente significativo em relação à folha em plantas de arroz (OHDAN et al., 2005, LI et al., 2009), principalmente em estágios de enchimento e maturação do grão (DUAN; SUN, 2005).

Os níveis de transcrição destes genes expressos no endosperma, também foram mensurados neste trabalho. Na análise realizada foi possível observar que o gene *OsPUL* (Figuras 5A e 7) aumentou consideravelmente seu número de transcritos aos 10 DAF para todos os genótipos, diminuindo gradualmente para BRS PAMPA e Nipponbare. Já para BRS Firmeza ocorreu um aumento na expressão deste gene de 72 vezes aos 15 DAF, logo ocorreu um decréscimo e um leve aumento aos 30 DAF, sugerindo que este gene desempenha um papel importante em toda a acumulação do amido no endosperma.

Em relação aos níveis de expressão dos genes *Os/SA1* e *Os/SA2*, foi possível verificar que o comportamento diferencial para o gene *Os/SA1* (Figuras 5B e 7) nos genótipos analisados foi aos 20 DAF, sendo que aos 10 DAF a cultivar BRS FIRMEZA obteve um pico no nível de expressão do gene (Figuras 5A e 7). Trabalhos anteriores demonstraram que estes genes são expressos na fase inicial do desenvolvimento do endosperma, sugerindo que estes genes possam estar atuando coordenadamente na síntese da amilopectina na fase inicial (OHDAN, et al., 2005). Ainda analisando esta família de genes, foi observado um comportamento diferenciado do gene *Os/SA2* (Figuras 5C e 7). Foi possível identificar um aumento significativo nos níveis de expressão deste gene aos 30 DAF para as cultivares Nipponbare (6x), BRS FIRMEZA (66x) e BRS PAMPA (5x). No entanto para a cultivar BRS PAMPA este aumento ocorreu também aos 20 DAF (9x), indicando que os maiores níveis na atividade deste gene ocorrem ao final do ciclo de desenvolvimento do endosperma.



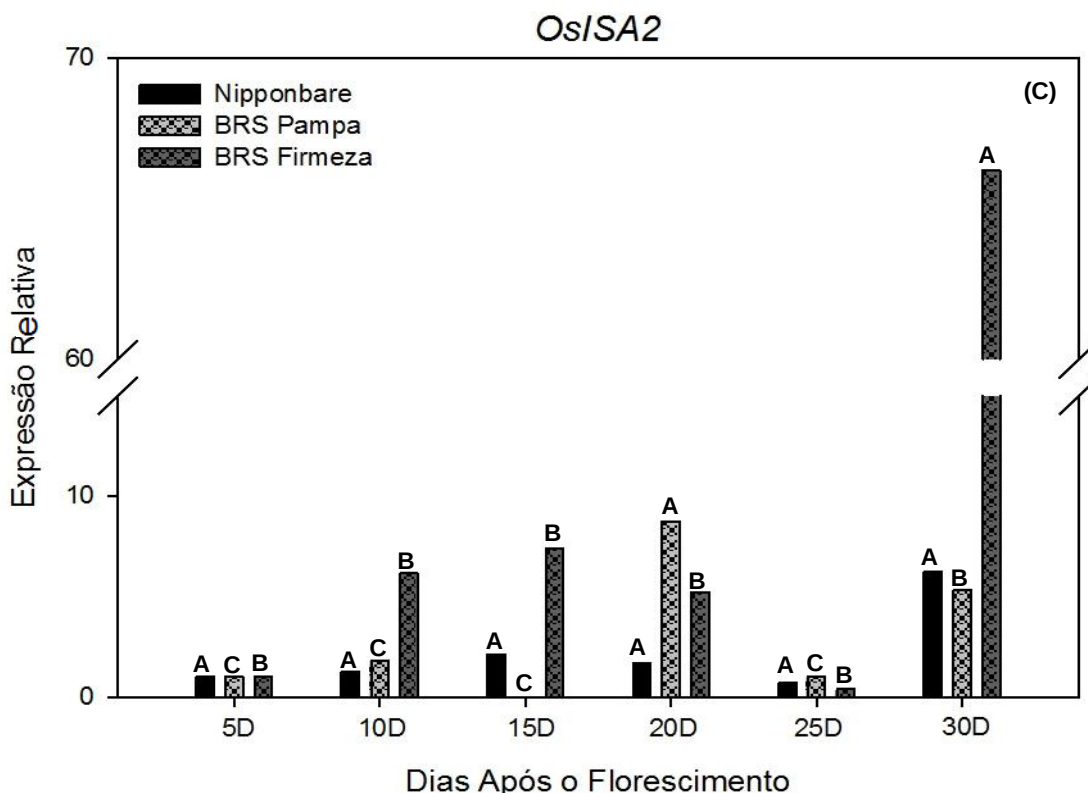


Figura 5. Gráfico com os perfis de expressão dos genes *OsPUL* (A), *OsISA1* (B) e *OsISA2* (C) envolvidos na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

GPT: O gene GPT1 (glicose-6-fosfato/fosfato-translocador) no início da via bioquímica da síntese do amido, codifica a enzima glicose-6-fosfato translocador, e está associado com o teor de amilose e a maior produção de amido no arroz (FISCHER; WEBER, 2002; KHARABIAN-MASOULEH et al., 2012).

A GPT1 é necessária para o transporte de carbono reduzido em plastídios, que é posteriormente utilizado para ambos, os lípidos e síntese de amilose. Tem sido sugerido que o teor de amilose está correlacionado com o teor de lípidos (MORRISON et al., 1993). A GTP1 está envolvida na concentração de ácido graxo plastidial e isto pode influenciar na formação de complexos amilose-lipídios (NIEWIADOMSKI et al., 2005).

A análise do perfil de expressão deste gene para as três cultivares contrastantes quanto ao teor de amilose estudadas neste trabalho permitiu observar que seu maior nível de expressão foi aos 20 DAF para todos os genótipos. Na cultivar Nipponbare o gene aumentou em 2,7 vezes a sua expressão, na cultivar

BRS Pampa este aumento foi de 8,8 vezes e na cultivar BRS Firmeza foi de 10 vezes, sugerindo que aos 20 DAF ocorre uma maior atividade deste gene e, consequentemente, um maior acúmulo de amido nos grãos (Figuras 6 e 7).

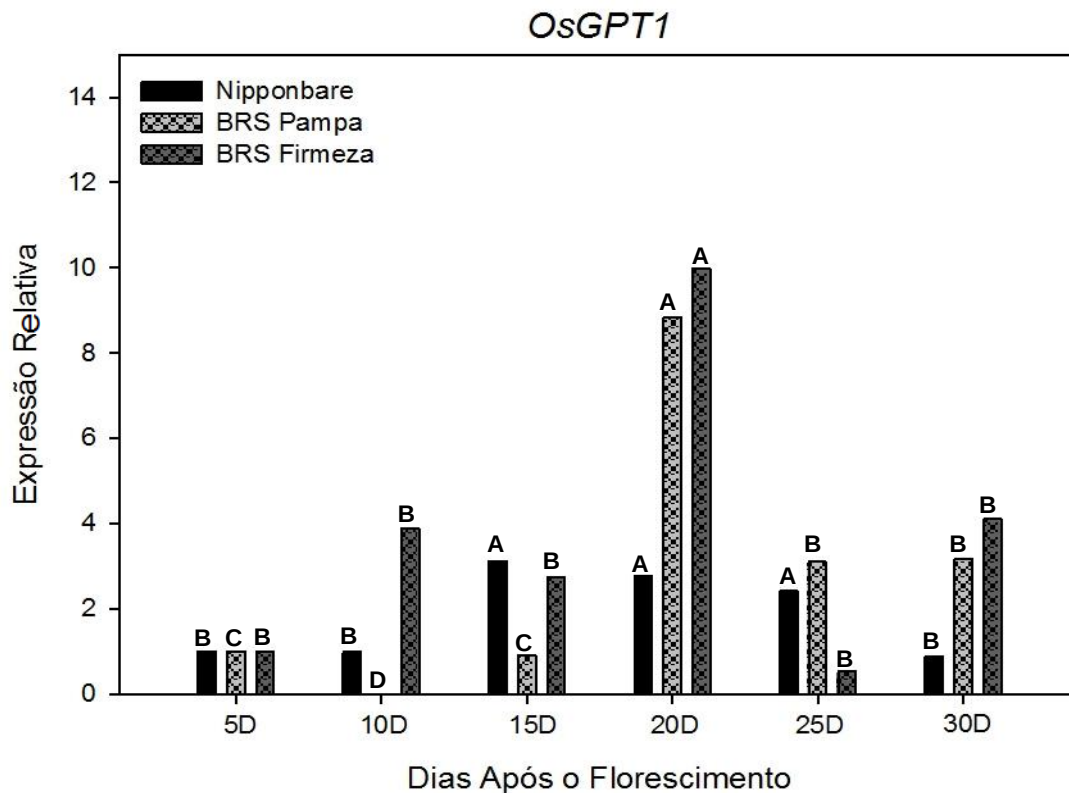


Figura 6. Gráfico com o perfil de expressão do gene *OsGPT1*, envolvido na síntese do amido, analisado em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF, em panículas de três genótipos de arroz irrigado. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

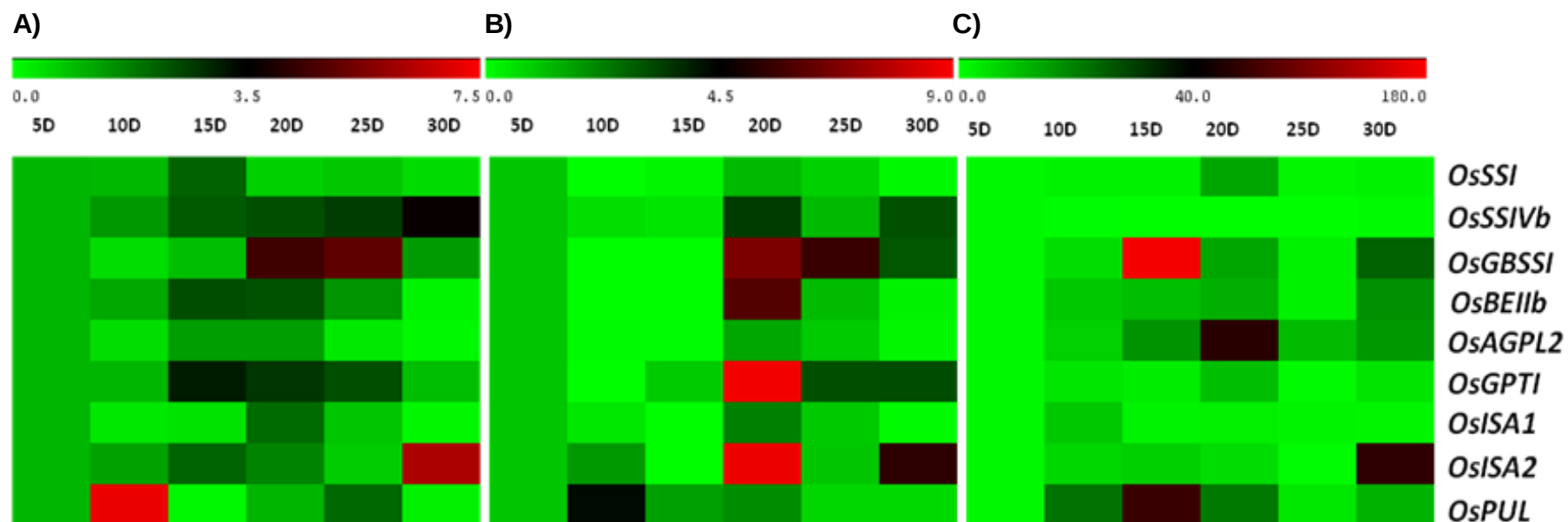


Figura 7. Perfil de expressão dos genes envolvidos na síntese do amido, analisados em cinco tempos de coleta (10DAF, 15DAF, 20DAF, 25DAF e 30DAF), em panículas de três genótipos de arroz irrigado (A), Nipponbare, (B) BRS PAMPA e (C) BRS FIRMEZA, através da técnica de qPCR e representado por escalas que variam de 1 - 180, utilizando o *Mult Experiment Viewer* (TIGR MeV) (SAEED et al., 2003). Uma extremidade da escala representada pela cor verde claro indica o menor nível de expressão do gene e a outra extremidade representada pela cor vermelha claro indica o maior nível de expressão. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

3.4 Conclusões

Genótipos de arroz contrastantes quanto ao teor de amilose no grão apresentam expressão diferencial dos genes envolvidos na síntese do amido.

Alguns desses genes têm seus níveis de expressão alterados no início do desenvolvimento do endosperma, indicando uma maior contribuição no início do enchimento dos grãos e outros genes tem maior atividade no final do ciclo de desenvolvimento.

Existe uma tendência, principalmente, para a cultivar BRS FIRMEZA de aumento na expressão dos genes estudados aos 20 DAF com um declínio aos 25 DAF e um aumento novamente aos 30 DAF, evidenciando a relação existente entre a atividade destes genes com o caráter “*stay-green*” e a acumulação tardia de amido no endosperma deste genótipo.

É necessário que estudos mais aprofundados sejam realizados em cultivares da subespécie *indica* para que estes mecanismos sejam elucidados, pois com base nestes resultados ainda não é possível prever qual gene tem maior efeito no controle do caráter.

3.5 Referências

BALL, S.G.; MORELL, M.K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p. 207–233. 2003.

BEATTY, M.K.; RAHMAN, A.; CAO, H.; WOODMAN, W.; LEE, M.; MYERS, A.M.; JAMES, M.G. Purification and molecular genetics characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. **Plant Physiology**, v.119, p.255–266, 1999.

BETT-GARBER, K. L.; CHAMPAGNE, E. T.; MCCLUNG, A. M.; OLDENHAUER, K. A.; INSCOMBE, S. D.; MCKENZIE, K. S. Categorizing rice cultivars based on cluster analysis of amylose content, protein content and sensory attributes. **Cereal Chemistry**, v.78, p.551–558. 2001.

BHAVE, M.R.; LAWRENCE, S.; BARTON, C.; HANNAH, L.C. Identification and molecular characterization of shrunken-2 cDNA clones of maize. **The Plant Cell**, v.2, p.581–588, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de**

Sementes, Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 2009.

BURTON, R.A.; JENNER, H.; CARRANGIS, L.; FAHY, B.; FINCHER, G.B.; HYLTON, C.; LAURIE, D.A.; PARKER, M.; WAITE, D.; VAN WEGEN, S. Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. **Plant Journal**, v.31, p. 97–112, 2002.

CAO, H.; IMPARL-RADOSEVICH, J.; GUAN, H.; KEELING, P.L.; JAMES, M.G.; MYERS, A.M. Identification of the soluble starch synthase activities of maize endosperm. **Plant Physiology**, v.120, p.205–215, 1999.

COLLEONI, C.; DAUVILLE´E, D.; MOUILLE, G. Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. **Plant Physiology**, v.120, p.993–1003, 1999.

COMMURI, P.D.; KEELING, P.L. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. **Plant Journal**, v.25, p. 475-86, 2001.

DELVALLE, D.; DUMEZ, S.; WATTEBLED, F.; ROLDA, N. I.; PLANCHOT, V.; BERBEZY, P.; COLONNA, P.; VYAS, D.; CHATTERJEE, M.; BALL, S.; MERIDA, A.; D'HULST, C. Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. **The Plant Journal**, v. 43, p. 398–412, 2005.

DEPREZ, R.H.L. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v.307, p. 63-69, 2002.

DIAN, W.; JIANG, H.; WU, P. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p. 623–632. 2005.

DUAN, M.; SUN, S.S.M. Profiling the expression of genes controlling rice grain quality. **Plant Molecular Biology**, v.59, p.165–178. 2005.

FISCHER, K.; WEBER, A. Transport of carbon in non-green plastids. **Trends Plant Science**, v.7, p.345–351, 2002.

FU, Y.B.; BALLICORA, M.A.; LEYKAM, J.F.; PREISS, J. Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p.25045–25052, 1998.

FUJITA, N.; YOSHIDA, M.; ASAKURA, N.; OHDAN, T.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; NAKAMURA, Y. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. **Plant Physiology**, v.140, p.1070–1084, 2006.

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v.32, n. 3, p.177-191, 1997.

- GUAN, H.P.; PREISS, J. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). **Plant Physiology**, v.102, p.1269-1273, 1993.
- HANNAH, L.C.; SHAW, J.R.; GIROUX, M.J.; REYSS, A.; PRIOUL, J.L.; BAE, J.M.; LEE, J.Y. Maize genes encoding the small subunit of ADPglucose pyrophosphorylase. **Plant Physiology**, v.127, p.173–183, 2001.
- HIROSE, T.; OHDAN, T.; NAKAMURA, C.Y.; TERAQ, A.T. Expression profiling of genes related to starch synthesis in rice leaf sheaths during the heading period. **Plant Physiology**, v.128, p.425–435. 2006.
- HIROSE, T.; TERAQ, T. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v.220, p.9–16. 2004.
- HOSACK, D. A.; DENNIS, G. JR.; SHERMAN, B.T.; LANE, H.C.; LEMPICKI, R.A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biology**, v.4, 2003.
- JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646–651. 2006.
- JAMES, M.G.; DENYER, K.; MYERS, A.M. Starch synthesis in the cereal endosperm. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.215–222, 2003.
- JEON, J-S.; RYOO, N.; HAHN, T-R.; WALIA, H.; NAKAMURA, Y. Starch biosynthesis in cereal endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.383-392. 2010.
- JULIANO, B. O.; ONATE, L. U.; MUNDO, A. M. D. Relation of starch composition, protein content, and gelatinization temperature to cooking and eating qualities of milled rice. **Food Technology**, v.19, p.116–121. 1965.
- KHARABIAN-MASOULEH, A.; WATERS, D.L.E.; REINKE, R.F.; WARD, R.; HENRY, R.J. SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. **Plant Biotechnology Journal**, v.10, n.3, p.53-62, 2012.
- KUBO, A.; RAHMAN, S.; UTSUMI, Y.; LI, Z.; MUKAI, Y.; YAMAMOTO, M.; UGAKI, M.; HARADA, K.; SATOH, H.; KONIK- ROSE, C.; MORELL, M.; NAKAMURA, Y. Complementation of *sugary-1* phenotype in rice endosperm with the wheat Isoamylase1 gene supports a direct role for Isoamylase in amylopectin biosynthesis. **Plant Physiology**, v.137, p.43-56, 2005.
- LI, Q.F.; ZHANG, G.Y.; DONG, Z.W.; YU, H.X.; GU, M.H.; SUN, S.S.; LIU, Q.Q. Characterization of expression of the OsPUL gene encoding a pullulanase-type debranching enzyme during seed development and germination in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, n.5, p.351-8. 2009.
- MAGALHÃES JÚNIOR, A.M.; GOMES, A.S.; ANDRES, A. **Arroz irrigado: melhoramento genético, manejo do solo e da água e prognóstico climático.**

Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2003. p.13-33. (Embrapa Clima Temperado, Documentos, 113).

MIZUNO, K.; KAWASAKI, T.; SHIMADA, H.; SATOH, H.; KOBAYASHI, E.; OKUMURA, S.; ARAI, Y.; BABA, T. Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, p. 19084–19091, 1993.

MORRISON, W. R.; TESTER, R. F.; GIDLEY, M.J.; KARKALAS, J. Resistance to acid hydrolysis of lipid-complexed amylose and lipid-free amylose in lintnerised waxy and non-waxy barley starches. **Carbohydrate Research**, v.245, p.289–302, 1993.

MYERS, A.M.; MORELL, M.K.; JAMES, M.G.; BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. **Plant Physiology**, v. 122, p. 989-997. 2000.

NAKAMURA, Y.; UTSUMI, Y.; SAWADA, T.; AIHARA, S.; UTSUMI, C.; YOSHIDA, M. et al. Characterizations of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. **Plant and Cell Physiology**, v.51, p.776-794, 2010.

NAKAMURA, Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. **Plant and Cell Physiology**, v.43, p.718–725. 2002.

NELSON, O.; D. PAN. Starch synthesis in maize endosperms. Annu. Rev. Plant Physiol. **Plant Molecular Biology**, v.46, p.475-496. 1995.

NIEMIADOMSKI, P.; KNAPPE, S.; GEIMER, S.; FISHER, K.; SCHULZ, B.; UNTE, U. S.; ROSSO, M.G.; ACHE, P.; FLUGGE, U.I.; SCHNEIDER, A. The Arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GTP1 is essential for pollen maturation and embryo development. **Plant Cell**, v.17, p.760–774, 2005.

NISHI, A.; NAKAMURA, Y.; TANAKA, N.; SATOH, H. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. **Plant Physiology**, 127, 459–472. 2001.

OHDAN, T.; FRANCISCO, P.B.; SAWADA, T.; HIROSE, T.; TERAOKA, T.; SATOH, H.; NAKAMURA, Y. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.3229–3244, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n. 9, p.2002-2007, 2001.

RAMPINO, P.; SPANO, G.; PATALEO, S.; MITA, G.; NAPIER, J.A.; DI FONZO, N.; SHEWRY, P.R.; PERROTTA, C. Molecular analysis of a durum wheat 'stay green' mutant: expression pattern of photosynthesis-related genes. **Journal of Cereal Science**, v.43, p.160-168, 2006.

RASMUSSEN, R Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C,

Nakagawara K (eds). Rapid cycle real-time PCR, methods and applications. **Springer Press**, Heidelberg. 2001.

SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, v. 34, 374. 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 2001.

SATO, K. Starch granules in tissues of rice plants and their changes in relation to plant growth. **JAQR**, v.18, p.79–86. 1984.

SIKKA, V.K.; CHOI, S.; KAVAKLI, I.H.; SAKULSINGHARAJ, C.; GUPTA, S.; ITO, H.; OKITA, T.W. Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. **Plant Science**, v.161, 461–468. 2001.

SLATERY, C.J.; KAVAKLI, H.; OKITA, T.W. Engineering starch for increased quantity and quality. **Trends in Plant Science**, v.5, n.7, p.291-298, 2000.

SMITH, A.M.; DENYER, K.; MARTIN, C. The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 67-87. 1997.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002. 86p.

STONE, B.; MORELL, M.K. CARBOHYDRATES. IN: KHAN, K., SHEWRY, P.R. (Eds.) **Wheat: Chemistry and Technology**, AACC, St. Paul, USA, p. 299–362. 2009.

SUN, S. Y.; HAO, W.; LIN, H.X. Identification of QTLs for cooking and eating quality of rice grain. **Rice Science**, v.13, p.161–169. 2006.

TAKEDA, Y.; GUAN, H.P.; PREISS, J. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. **Carbohydrate Research**, v.240, p.253-263, 1993.

TANAKA, N.; FUJITA, N.; NISHI, A.; SATOH, H.; HOSAKA, Y.; UGAKI, M.; KAWASAKI, S.; NAKAMURA, Y. The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. **Plant Biotechnology**, Journal 2, p.507–516. 2004.

TETLOW, I.J., DAVIES, E.J., VARDY, K.A., BOWSHER, C.G., BURRELL, M.M., EMES, M.J. Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p.715–725. 2003.

TETLOW, I.J. Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement. **Canadian Journal of Botany**, v.84, p.1167-1185. 2006.

THOMPSON, D.B. On the non-random nature of amylopectin branching. **Carbohydrate Polymers**, v.43, p.223–239. 2000.

TIAN, Z.; QIAN, Q.; LIU, Q.; YAN, M.; LIU, X.; YAN, C, et al. Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.106, p.21760-21765. 2010.

ZHANG, G.; CHENG, Z.; ZHANG, X.; GUO, X.; SU, N.; JIANG, L.; et al. Double repression of soluble starch synthase genes *SSIIa* and *SSIIIa* in rice (*O. sativa* L.) uncovers interactive effects on physic-chemical properties of starch. **Genome**, v.54, p.448-459. 2011.

ZHU, L.; GU, M.; MENG, X.; CHEUNG, S.C.; YU, H.; HUANG, J.; SUN, Y.; SHI, Y.; LIU, Q. High-amylose rice improves indices of animal health in normal and diabetic rats. **Plant Biotechnology Journal**, v.10, n.3, p.353-62. 2012.

4. CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE ARROZ TOLERANTES AO ESTRESSE POR FERRO

4.1 Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo o principal alimento para mais da metade da população mundial, além de desempenhar um importante papel tanto a âmbito social e econômico quanto cultural. Atualmente é o segundo cereal mais produzido no mundo (FAO, 2012). O Brasil apresenta papel de destaque, sendo o 1º país fora da Ásia em produção e consumo de arroz. Ressalta-se que o Rio Grande do Sul tem importância fundamental neste processo, sendo responsável por cerca de 60% da produção total deste cereal no País (CONAB, 2012).

O sistema de cultivo irrigado é o principal e mais produtivo método de cultivo de arroz na região Sul, produzindo anualmente cerca de 6,3 milhões de toneladas (CONAB, 2012). Neste tipo de cultivo, os solos são inundados e o oxigênio presente é rapidamente esgotado pelos microrganismos e raízes das plantas. Após a inundação, o ambiente torna-se hipóxico, ocorrendo a redução de óxidos e hidróxidos de ferro o que, conseqüentemente, resulta no acúmulo de elevadas concentrações de ferro reduzido (Fe^{2+}) na solução do solo, podendo ocasionar problemas de toxidez para as plantas cultivadas neste ambiente (RATERING; SCHNELL, 2000).

A toxidez por ferro é um tipo de estresse abiótico que limita a produção do arroz irrigado em nível mundial (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000; WARDA, 2001), podendo levar a perdas consideráveis na produção que podem representar alta redução no rendimento (BENCKISER et al., 1982; SAHRAWAT; DIATTA, 1996;

AUDEBERT; SAHRAWAT, 2004) quando as cultivares apresentam sensibilidade. De acordo com Bacha (1993), nas condições brasileiras as reduções na produtividade podem chegar a 80%.

A seleção de genitores e a caracterização da variabilidade genética existente são decisivas para o incremento de eficiência em programas de melhoramento genético, pois uma das principais necessidades é a identificação de plantas que possuam genes responsáveis por determinada característica de interesse (BRAMMER, 2002), como, por exemplo, a tolerância ao estresse por ferro.

A obtenção de variabilidade mediante o emprego de agentes mutagênicos químicos ou por radiações tem sido amplamente empregada no melhoramento genético em função da capacidade de alterar uma ou mais características desejáveis, podendo assim melhorar as cultivares já existentes desenvolver novos genótipos (MALUSZYNSKI et al., 1998).

A radiação gama (Co^{60}) é um agente físico considerado um dos principais indutores de mutação e de aberrações cromossômicas estruturais em seres vivos (PIMENTEL, 1990). Sendo assim, este vem sendo utilizado também com o objetivo de obter mutantes de arroz com alta produtividade e tolerância aos estresses bióticos e abióticos. As mutações induzidas têm sido usadas em trigo, arroz, algodão, amendoim e feijão, entre outras. Mais de 1800 cultivares, obtidas diretamente como mutantes induzidos por radiações ou derivadas de cruzamentos envolvendo tais mutantes, foram liberadas em 50 países (AHLOOWALIA; MALUSZYNSKI, 2001).

Entretanto, ao induzir a mutação não se pode saber ao certo qual característica esta planta virá a apresentar, pois ela não é direcionada a genes específicos, não se tem controle dos genes que estão sendo alterados. Portanto, é necessário fazer vários testes em um grande número de indivíduos submetidos ao agente mutagênico, fazendo a seleção daqueles que apresentam a característica desejada.

Diante disso, este trabalho, teve como objetivo realizar a caracterização de famílias mutantes de arroz quanto à tolerância ao estresse por toxidez de ferro em cultivo hidropônico.

4.2 Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no laboratório de hidropônia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) e no laboratório de Nutrição de Plantas (Solos), pertencentes à Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Foram utilizados três genótipos de arroz irrigado, previamente caracterizados a campo e recomendados pela SOSBAI (2010): BRS 7 Taim, Epagri 108, BR-Irga 409 e nove famílias mutantes de arroz, na geração M9: CGF-Z-M9-192, CGF-Z-M9-53, CGF-Z-M9-328, CGF-Z-M9-243, CGF-Z-M9-22P, CGF-Z-M9-204, CGF-Z-M9-65, CGF-Z-M9-303CD, CGF-Z-M9-444CD1, quanto a tolerância ao estresse por ferro sob condições controladas. Os mutantes foram obtidos a partir da cultivar BRS 7 Taim, por meio de irradiações de raios gama provenientes do ^{60}Co em uma dosagem de 200 a 250 Gy, em um aparelho (Eldorado 78) do Centro Regional de Oncologia da UFPel no ano de 1999 (ZIMMER et al., 2003). Os mutantes que fazem parte do acervo do Centro de Genômica e Fitomelhoramento/FAEM/UFPel.

A cultivar BRS 7 Taim, que deu origem ao banco de mutantes, apresenta diversas características de interesse agrônomo, como elevada capacidade produtiva ($10.000 \text{ kg ha}^{-1}$); ciclo reprodutivo médio (130 dias); alta capacidade de afilamento, folhas eretas, porte médio (80 cm), tipo de grão *patna* (agulhinha), de casca lisa, clara e sem aristas e boa reação às raças de brusone (*Magnaporthe grisea*). No entanto, apresenta um comportamento moderadamente tolerante a toxicidade de ferro e é sensível ao estresse por frio e toxidez por alumínio, o que leva a uma diminuição na produtividade afetando seu rendimento médio (SOSBAI, 2010).

As sementes passaram por um processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, após foram lavadas três vezes em água, para posterior acondicionamento em rolos de papel germinador, umedecido com água ultrapura. Posteriormente, foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26°C , com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa de 100% por 72 horas, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Plântulas apresentando comprimento de raiz uniforme foram dispostas em telas de náilon, adaptadas a recipientes plásticos de dois litros de capacidade, de modo a manter a raiz permanentemente em contato com a solução nutritiva para arroz

(YOSHIDA et al., 1976) modificada contendo: 40 mg L⁻¹ de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄; 10 mg L⁻¹ de hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄); 40 mg L⁻¹ de nitrato de potássio (KNO₃); 40 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio (CaNO₃); 40 mg L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O); 0,5 mg L⁻¹ sulfato de Manganês monohidratado (MnSO₄.H₂O); 0,05 mg L⁻¹ molibdato de sódio dihidratado (Na₂MoO₄.2H₂O); 0,58 mg L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl); 0,2 mg L⁻¹ de ácido bórico (H₃BO₃); 0,01 mg L⁻¹ de sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄.7H₂O), 0,01 mg L⁻¹ sulfato de cobre monohidratado (CuSO₄.H₂O), 2 mg L⁻¹ sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄.7H₂O).

As plântulas permaneceram nesta solução por 28 dias. A troca da solução nutritiva foi realizada a cada 7 dias e os recipientes foram mantidos em um tanque hidropônico com água a uma temperatura de 26 ± 1°C, com fotoperíodo de 16 horas.

Após este período, metade das plântulas foi mantida no tratamento controle (solução nutritiva padrão com 2mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O em pH 4,0 ± 0,1) e a outra metade foi transferida para o tratamento de estresse por de ferro (solução nutritiva padrão com 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O em pH 4,0 ± 0,1), onde permaneceram por três dias, conforme protocolo descrito por Asch et al. (2005). Quando necessário, durante o período de estresse, o pH da solução foi aferido duas vezes ao dia e corrigido através da adição de NaOH 1mol L⁻¹ ou HCl 1N.

Foram mensuradas as variáveis: comprimento de raiz (CR), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento do coleóptilo (CC) em cm e número de raízes (NR). Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em estufa com circulação de ar a 65°C até atingirem peso constante para subsequente determinação dos teores de cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) acumulado na parte aérea das plântulas, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Foram realizadas avaliações visuais após três dias de tratamento com Fe²⁺ na concentração de 2000 mg L⁻¹, seguindo um sistema de pontuação padrão utilizado pelo IRRI (*International Rice Research Institute*) adaptada do *Standard Evaluation System for Rice* para avaliar sintomas de toxidez por ferro em arroz.

Os sintomas visuais foram baseados nas reações de morte das folhas e intensidade de sintomas de toxidez, comparando com as testemunhas. As graduações obedeceram a uma escala variável de 0-9. Plantas tolerantes (T) recebem notas de 0-3, as mediamente tolerante (MT) de 4-5 e as sensíveis (S) de 6-9 (IRRI, 1975).

Os genótipos utilizados como testemunhas nesta avaliação foram BR-IRGA 409 (sensível) e Epagri 108 (tolerante), caracterizados a campo e recomendados pela SOSBAI (2010).

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, em esquema fatorial simples tratamento x genótipo (2x12) com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparação de médias e teste de correlação de Pearson, ambos utilizando o nível de significância de $P \leq 0,05$, pelo teste F. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002).

4.3 Resultados e Discussão

Os resultados do resumo da análise de variância (Tabela 1) mostraram efeitos significativos, a 5% de probabilidade, para efeito dos genótipos e tratamentos (teste F) para as variáveis analisadas (CPA, CC, CR, NR, Fe, Zn e Mn), com exceção da variável teor de cobre (Cu), que não apresentou significância, para o efeito de tratamento, demonstrando assim que houve variabilidade nos genótipos para esta variável mas quando submetidos aos diferentes tratamentos, estes apresentaram comportamento inalterado. Estes resultados indicam que o tratamento de estresse por excesso de ferro e os caracteres utilizados em resposta deste, foram eficientes para distinguir os genótipos.

Em relação ao efeito de interação genótipo x tratamento (G x T), este foi significativo para as variáveis (CC, NR, Fe e Mn), indicando que os genótipos avaliados responderam diferencialmente frente aos tratamentos aplicados, de acordo com a análise destas variáveis.

O fato de algumas variáveis (CPA, CR, Cu e Zn) não apresentarem interação significativa indica que o efeito do ferro nos diferentes genótipos teve a mesma magnitude. Ainda de acordo com esta análise, foi possível constatar que os valores atribuídos ao coeficiente de determinação (R^2) e ao coeficiente de variação (CV) de modo geral indicam confiabilidade aos resultados obtidos.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância, para as variáveis comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleótilo (CC), comprimento de raiz (CR), em cm, número de raiz (NR), teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg Kg^{-1} , de 12 genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1= solução nutritiva padrão com 2 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e de estresse por ferro (T2= 2000 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), em solução hidropônica. CGF/FAEM/UFPel/ 2012.

Fonte de Variação	GL	QM							
		CPA (cm)	CC (cm)	CR (cm)	NR	Fe (mg Kg^{-1})	Cu (mg Kg^{-1})	Zn (mg Kg^{-1})	Mn (mg Kg^{-1})
Genótipo	11	23,17*	0,14*	2,16*	13,35*	61860730*	23,87*	1052950,85*	5424,37*
Tratamento	1	9,6*	0,03	14,54*	91,91*	18911239506*	1,13	66241498,94*	372127,53*
G x T	11	3,19	0,04*	1,23	5,25*	60173625*	4,29	298095,94	2078,47*
ERRO	48	2,34	0,01	0,71	1,49	29560438	3,49	199466,25	637,13
Média	-	24,67	1,30	12,59	14,19	16381,07	9,76	1436,01	172,32
R ²	-	0,73	0,79	0,60	0,80	0,93	0,65	0,89	0,94
CV (%)	-	6,19	8,12	6,68	8,61	33,19	19,14	31,10	14,65

* valores significativos a 5% de probabilidade de erro pelo teste F; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; GxT = genótipo x tratamento; cm = centímetros, mg Kg^{-1} = miligramas por quilo.

Para a fenotipagem (caracterização da variabilidade genética) de um germoplasma com base genética estreita, é importante a identificação de caracteres contrastantes em indivíduos muito parecidos. Sendo assim, uma variável apropriada para estudos de distância genética pode ser considerada aquela que apresentar maior magnitude da variação, e que também apresente efeito significativo para interação genótipo x tratamento, pois discrimina de maneira mais eficiente às diferentes respostas dos genótipos frente aos tratamentos utilizados. Com base neste estudo, as variáveis que satisfazem estas condições são teor de Fe, Mn, CC e NR, pois apresentaram interação significativa nos tratamentos e elevada variação (Tabelas 2 e 3; Figuras 1A, 1D, 2C e 2D).

Os tratamentos T1 (controle) e T2 (estresse por ferro) evidenciaram diferença significativa para a variável teor de Fe. O genótipo BR-IRGA 409, caracterizado como sensível à toxidez por ferro a campo, apresentou alto acúmulo de ferro nos tecidos. Diferentemente do genótipo Epagri 108, caracterizado como tolerante, mas que também acumulou teores significativos de Fe, no entanto, em concentrações consideravelmente inferiores às encontradas no genótipo sensível (Tabelas 2; Figura 1A). Todavia, pode-se constatar que tanto os genótipos tolerantes quanto sensíveis, acumularam elevados teores de ferro na parte aérea. Resultados semelhantes ao deste estudo, no qual plantas sensíveis e tolerantes acumularam elevados níveis de ferro tanto em tecidos radiculares quanto na parte aérea, foram

encontrados (SILVEIRA et al., 2007, STEIN et al., 2009; BRESOLIN, 2011). No entanto, o teor de Fe encontrado no genótipo sensível foi ainda mais elevado do que o observado no genótipo tolerante. Foi possível verificar que o genótipo BRS 7 TAIM, que originou as famílias mutantes analisadas neste estudo, apresentou teores de Fe maiores (próximo a 1,5x) que o genótipo caracterizado como sensível a campo (BR-IRGA 409) (Tabelas 2; Figura 1A).

Através do comportamento individual das famílias mutantes de arroz, foi possível identificar comportamentos distintos quanto ao acúmulo de ferro, no entanto, as famílias CGF-Z-M9-243 e CGF-Z-M9-444CD, apresentaram menor acúmulo deste nutriente quando expostas ao estresse, sendo os valores semelhantes ao genótipo caracterizado a campo como tolerante (Epagri 108).

O teor de cobre acumulado nos tecidos dos genótipos permaneceu praticamente inalterado em resposta aos tratamentos, identificando que os genótipos analisados não diferem quanto à absorção de Cu. Em função do tratamento de excesso de ferro empregado, os resultados indicam que as vias de absorção de Cu não foram alteradas nos mutantes, embora estes tenham apresentado níveis distintos de absorção de ferro (Tabelas 2; Figura 1B). Estes resultados estão de acordo com Soares_Bresolin et al. (2011), verificaram que o teor de Cu acumulado nos tecidos dos genótipos de arroz permaneceu inalterado frente aos tratamentos adotados.

Em relação à significância da variável teor de Zn para a interação genótipo x tratamento, foi observado que os valores das médias dos genótipos foram muito semelhantes dentro do tratamento controle. Entretanto, foi possível verificar aumento considerável no teor de Zn acumulado nos tecidos quando os genótipos foram expostos ao estresse por ferro. (Tabelas 2; Figura 1C). Estes resultados sugerem que os canais de Zn foram associados com o excesso de ferro. Os resultados obtidos por Sichul; Gynheung (2009) mostraram que quando havia excesso de zinco, os níveis de Fe, Mn e Cu foram severamente afetados. Da mesma forma que o excesso de Cd alterou as concentrações de outros metais, é provável que o excesso de Zn ou Cd interfira na absorção de metais do solo, bem como na translocação para a parte aérea, indicando que eles podem estar compartilhando a mesma rede de regulação.

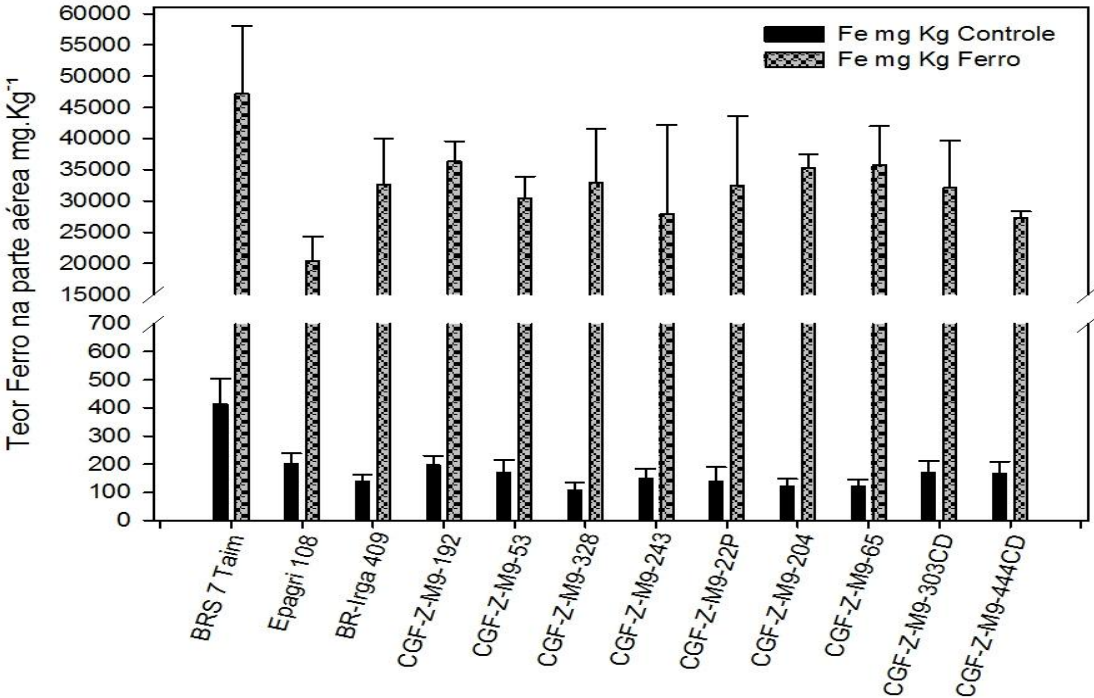
Foi detectada variação entre as famílias dentro de cada tratamento, o genótipo BRS 7 TAIM apresentou um acúmulo de Zn maior em relação às demais famílias analisadas e a cultivar Epagri 108, apresentou o menor acúmulo, reafirmando as alterações na via de absorção de metais nas famílias mutantes (Tabela 2; Figura 1C).

A variável teor de Mn apresentou comportamento semelhante ao do Fe (Figura 1D). O genótipo tolerante (Epagri 108) foi o que menos acumulou Mn, assim como as famílias CGF-Z-M9-328, CGF-Z-M9-243, CGF-Z-M9-303CD e CGF-Z-M9-444CD. Ressalta-se que a família CGF-Z-M9-444CD foi a que menos acumulou Mn nos tecidos, assim como ocorreu com a variável teor de Fe. Comparando as famílias em resposta aos tratamentos foi possível observar o aumento considerável no acúmulo de Mn no tratamento com excesso de ferro, assim como verificado anteriormente para os teores de Fe e Zn.

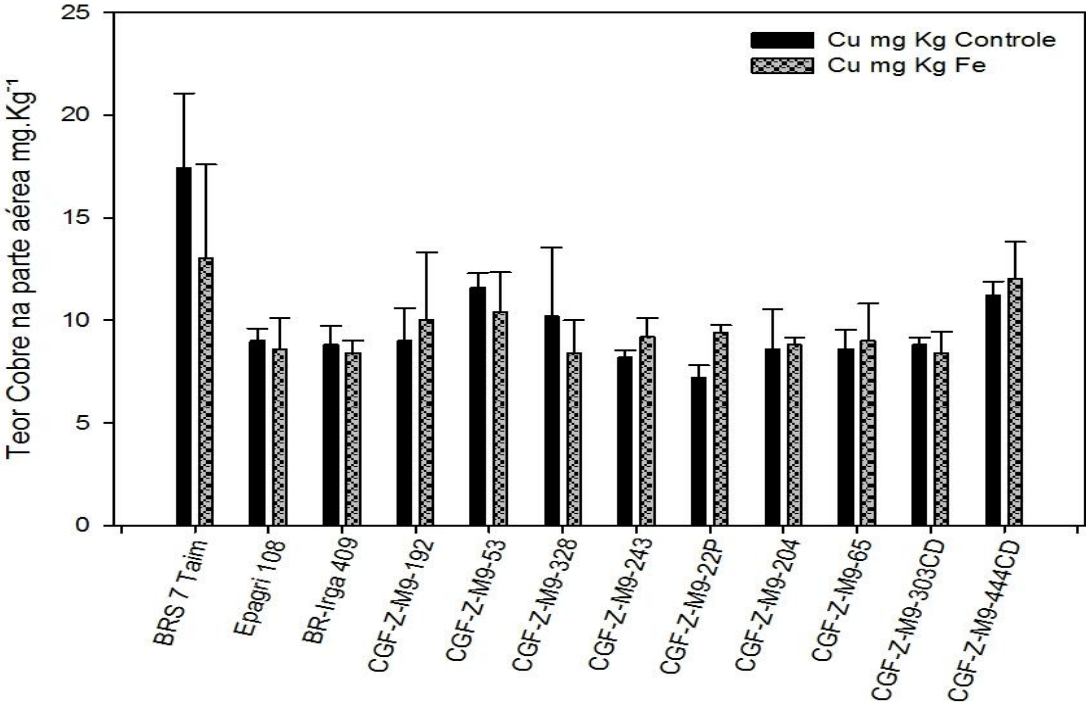
Tabela 2. Resposta das famílias mutantes de arroz irrigado para as variáveis teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg Kg⁻¹, de 12 genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1= solução nutritiva padrão com 2 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e de estresse por ferro (T2= 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), em solução hidropônica. CGF/FAEM/UFPel/ 2012.

GENÓTIPOS	Ferro		Cobre		Zinco		Manganês	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
BRS 7 Taim	B 414,43 a	A 47.195,91 a	A 17,41 a	A 13,01 a	B 778,00 a	A 4.220,42 a	B 163,39 a	A 294,54 a
Epagri 108	B 201,03 b	A 20.424,55 c	A 9,00 bcd	A 8,60 b	B 456,52 b	A 1.517,02 b	B 100,55 b	A 164,48 c
BR-Irga 409	B 137,11 bc	A 32.578,01 bc	A 8,80 bcd	A 8,40 b	B 394,41 b	A 2.350,08 b	B 79,78 b	A 238,25 abc
CGF-Z-M9-192	B 196,91 b	A 36.359,08 ab	A 9,00 bcd	A 10,01 ab	B 503,11 b	A 2.470,02 b	B 79,23 b	A 277,05 ab
CGF-Z-M9-53	B 170,10 bc	A 30.484,91 bc	A 11,61 b	A 10,41 ab	B 389,75 b	A 2.282,01 b	B 170,49 a	A 285,25 ab
CGF-Z-M9-328	B 108,25 c	A 32.983,12 bc	A 10,21 bcd	A 8,40 b	B 349,38 b	A 2.145,87 b	B 75,41 b	A 207,65 bc
CGF-Z-M9-243	B 149,48 bc	A 27.952,94 bc	A 8,20 cd	A 9,21 ab	B 397,52 b	A 2.129,66 b	B 71,58 b	A 212,02 bc
CGF-Z-M9-22P	B 139,18 bc	A 32.510,49 bc	B 7,20 d	A 9,41 ab	B 327,64 b	A 2.324,15 b	B 80,33 b	A 251,91 ab
CGF-Z-M9-204	B 119,59 bc	A 35.346,29 ab	A 8,60 bcd	A 8,80 b	B 405,28 b	A 2.476,50 b	B 81,97 b	A 236,61 abc
CGF-Z-M9-65	B 120,62 bc	A 35.766,89 ab	A 8,60 bcd	A 9,00 ab	B 425,47 b	A 2.495,95 b	B 73,77 b	A 242,08 abc
CGF-Z-M9-303CD	B 170,10 bc	A 32.139,13 bc	A 8,80 bcd	A 8,40 b	B 503,11 b	A 2.197,73 b	B 90,71 b	A 210,93 bc
CGF-Z-M9-444CD	B 165,98 bc	A 27.311,51 bc	A 11,21 bc	A 12,01 ab	B 391,30 b	A 2.132,90 b	B 144,26 a	A 246,45 ab

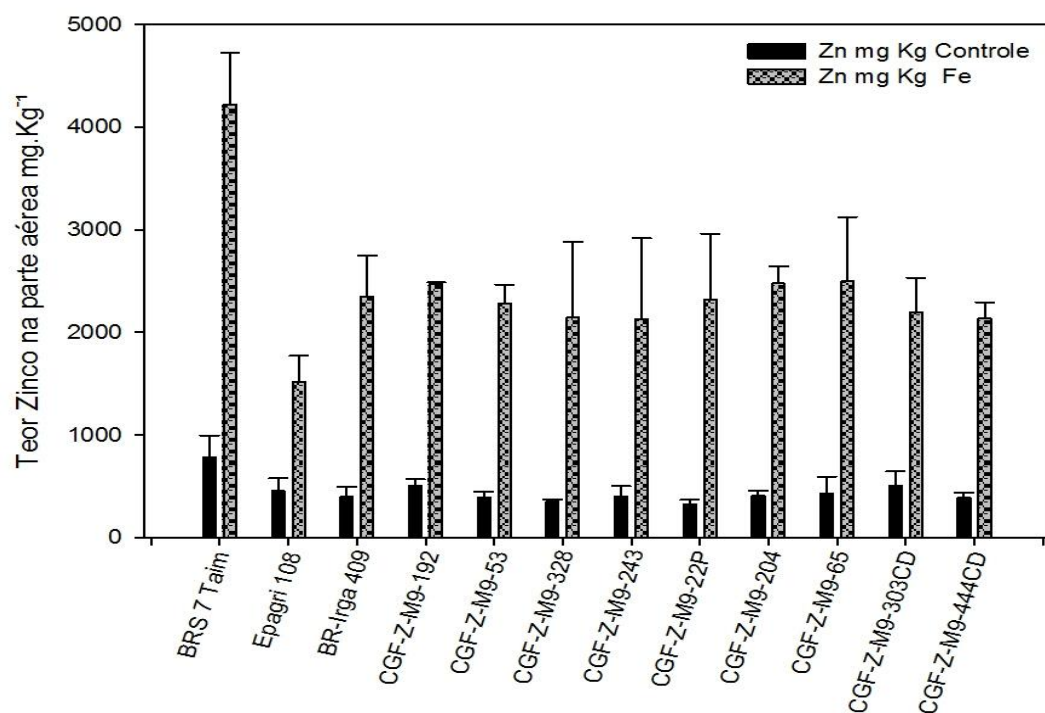
*médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferenciam significativamente; *médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferenciam significativamente.



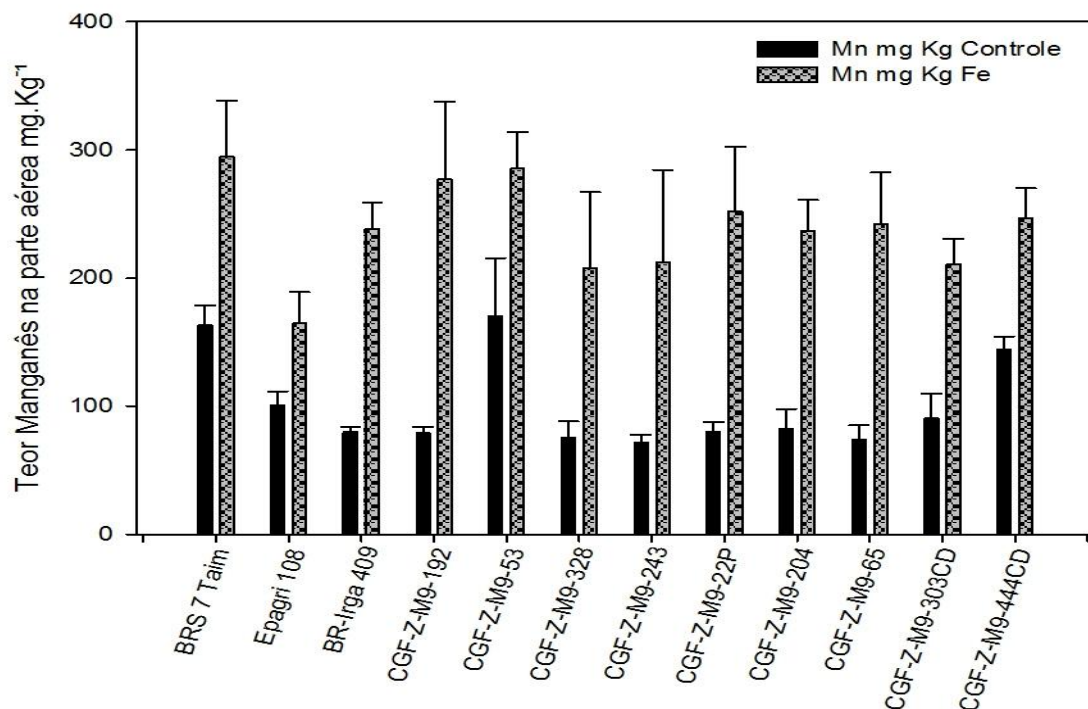
A)



B)



C)



D)

Figura 1. Concentração dos micronutrientes: A) Ferro (Fe), B) Cobre (Cu), C) Zinco (Zn) e D) Manganês (Mn) na parte aérea de 12 genótipos de arroz submetidos à condição controle (T1) e condição de estresse por ferro (T2). CGF/FAEM/UFPEL, 2012.

Em relação às variáveis morfológicas, foi possível observar que as famílias obtiveram valores diferenciais para CPA e CR, assim como para cada tratamento, porém, não houve interação significativa (G x T). Isto indica que houve uma redução no CPA e CR, todavia esta redução não foi significativa entre as famílias (Tabela 3; Figuras 2A e 2B).

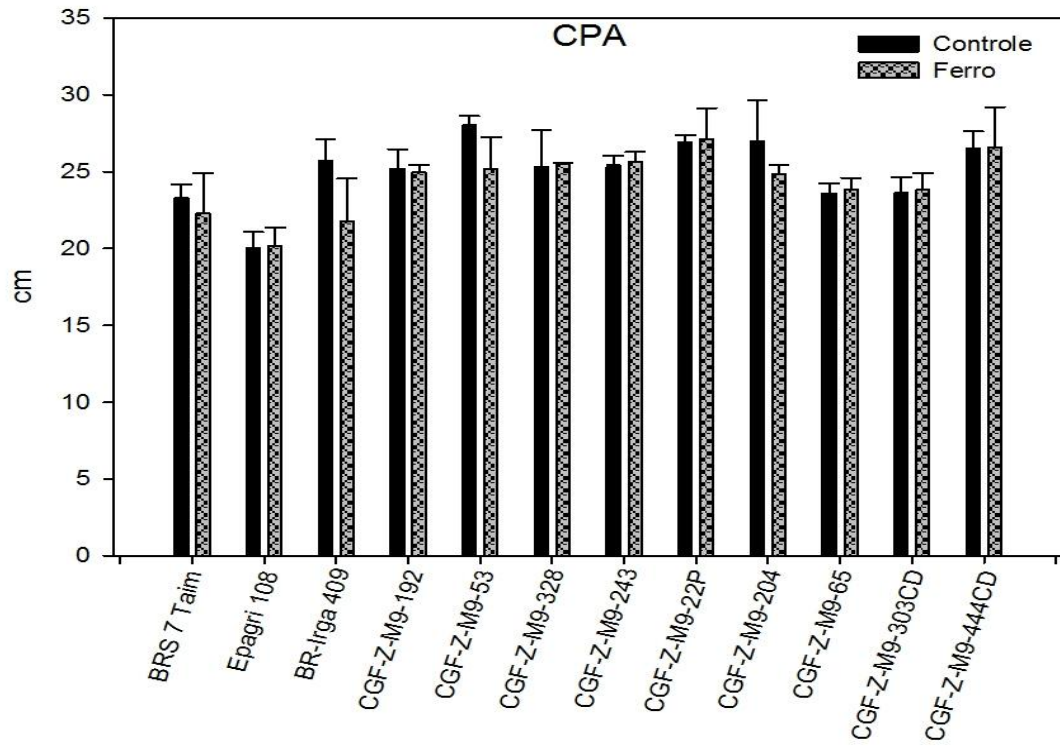
As variáveis CC e NR apresentaram diferenças estatísticas significativas, indicando que estas variáveis apresentaram respostas diferenciais em cada tratamento avaliado. Em plântulas de arroz submetidas a estresses abióticos, as raízes adventícias diminuíram seu crescimento, promovendo uma proliferação de calos na base do coleóptilo e aumentando o número de raízes laterais (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001; KOPP, 2008). Portanto, os resultados obtidos para as variáveis CC e NR, indicam que estas são eficientes em discriminar as respostas dos genótipos frente ao estresse (Tabela 3; Figuras 2C e 2D).

Tabela 3. Resposta das famílias mutantes de arroz irrigado para as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleóptilo (CC), comprimento de raiz (CR) em cm e número de raízes (NR), de 12 genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1= solução nutritiva padrão com 2 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O) e de estresse por ferro (T2= 2000 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O), em solução hidropônica. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

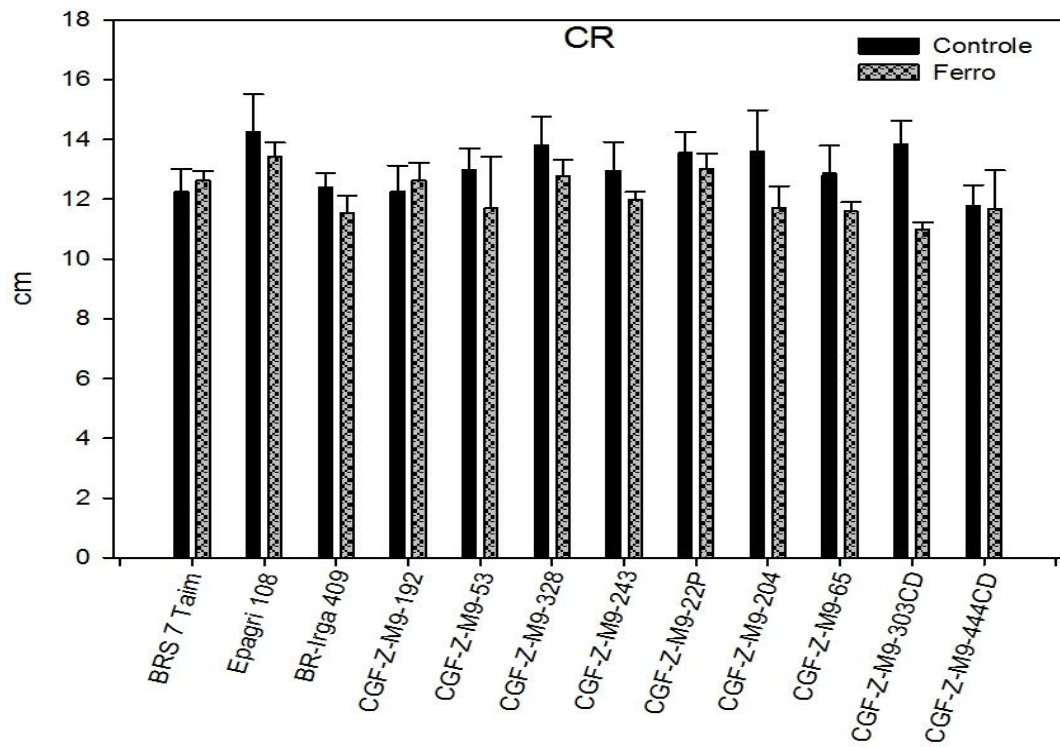
GENÓTIPOS	CPA		CC		CR		NR	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
BRS 7 Taim	A 23,27 c	A 22,31 abc	A 1,10 dc	A 1,02 c	A 12,27 bc	A 12,63 abc	A 15,10 bc	A 12,30 abc
Epagri 108	A 20,05 d	A 20,16 c	A 1,32 ab	A 1,37 ab	A 14,24 a	B 13,43 a	A 12,16 d	B 9,39 c
BR-Irga 409	A 25,72 abc	A 21,76 bc	A 1,05 d	A 0,94 c	A 12,39 bc	A 11,54 bc	A 14,95 bc	A 12,43 ab
CGF-Z-M9-192	A 25,18 bc	A 24,99 abc	A 1,47 a	A 1,45 ab	A 12,27 bc	A 11,64 bc	A 16,43 bc	A 15,87 a
CGF-Z-M9-53	A 28,02 a	A 25,17 ab	A 1,49 a	A 1,24 b	A 12,98 abc	A 11,69 abc	A 15,23 bc	B 12,80 bc
CGF-Z-M9-328	A 25,28 bc	A 25,52 ab	A 1,44 a	A 1,45 ab	A 13,79 ab	A 12,78 abc	A 14,30 bc	A 15,07 ab
CGF-Z-M9-243	A 25,40 abc	A 25,65 ab	A 1,30 abc	A 1,47 ab	A 12,95 ab	A 11,98 bc	A 15,93 c	A 12,13 bc
CGF-Z-M9-22P	A 26,90 ab	A 27,11 ab	A 1,15 bcd	A 1,18 b	A 13,55 ab	A 13,01 c	A 16,80 bc	B 11,53 bc
CGF-Z-M9-204	A 26,99 ab	A 24,82 ab	A 1,43 a	A 1,25 b	A 13,59 ab	A 11,71 ab	A 14,13 cd	A 12,50 ab
CGF-Z-M9-65	A 23,59 c	A 23,85 ab	A 1,48 a	A 1,32 ab	A 12,86 abc	A 12,60 abc	A 14,33 c	A 14,10 ab
CGF-Z-M9-303CD	A 23,61 c	A 23,84 ab	B 1,41 a	A 1,16 b	A 13,84 ab	A 12,10 abc	A 19,00 a	B 12,33 abc
CGF-Z-M9-444CD	A 26,49 ab	A 26,55 a	B 1,18 bcd	A 1,48 a	A 11,76 c	A 11,67 abc	A 15,43 bc	B 12,23 abc

*médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferenciam significativamente;

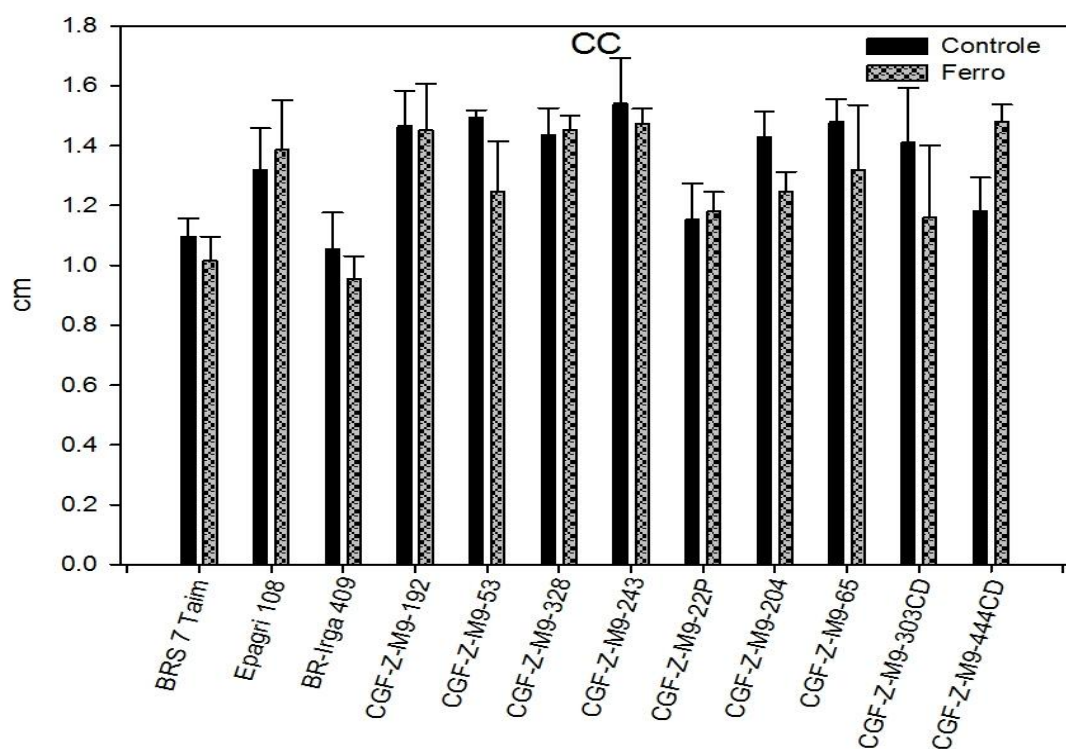
*médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferenciam significativamente.



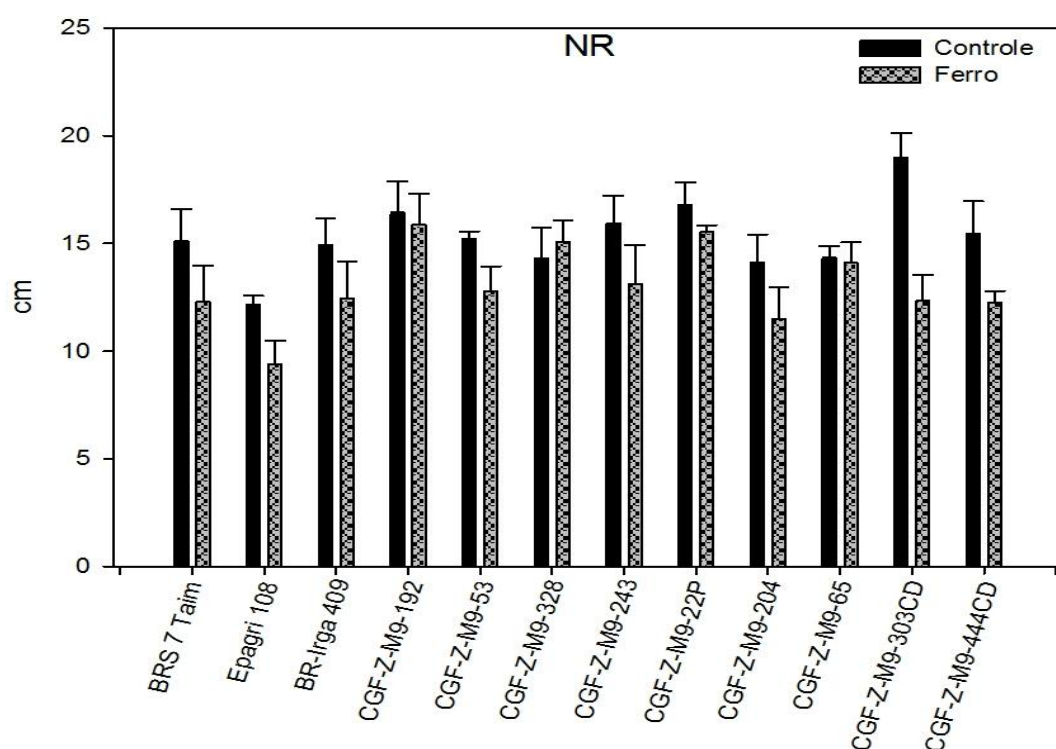
A)



B)



C)



D)

Figura 2. Avaliação morfológica dos caracteres: A) comprimento de parte aérea (CPA), B) comprimento de raiz (CR), C) comprimento de coleóptilo (CC) e D) número de raízes (NR) de 12 genótipos de arroz, submetidos à condição controle (T1) e de estresse por ferro (T2). CGF/FAEM/UFPEl, 2012.

Os micronutrientes avaliados neste estudo (Cu, Fe, Zn e Mn) são essenciais para o desenvolvimento das plantas, sendo requeridos em concentrações muito baixas para adequado crescimento e reprodução. São fundamentais como constituintes das membranas celulares (Zn), de enzimas (Fe, Mn, Cu), como ativadores de enzimas (Mn, Zn) e na fotossíntese (Fe, Cu, Mn) (MARSCHNER, 1995; MENGEL; KIRKBY, 2001; EPSTEIN; BLOOM, 2004). Também conferem resistência (Mn, Zn) a estresses bióticos e abióticos, incluindo pragas e moléstias (KIRKBY; RÖMHELD, 2007).

O teor inadequado de micronutrientes não só tem efeito direto sobre o desenvolvimento da cultura, mas também reduz a eficiência de uso dos fertilizantes contendo macronutrientes. Além disso, os micronutrientes (Cu, Mn, Zn) estão particularmente envolvidos na fase reprodutiva do crescimento das plantas e, conseqüentemente, na determinação da produtividade e da qualidade da cultura.

A interação de nutrientes é um dos fatores mais importantes que afetam a produtividade das culturas anuais, podendo ser positiva, negativa ou neutra (FAGERIA et al., 1997). Esta interação pode ser medida pelo crescimento das plantas e pelo teor dos nutrientes no tecido vegetal, ocorrendo na superfície das raízes ou no interior da planta (FAGERIA, 2000, FAGERIA et al., 2002), como foi verificado através da análise de correlação apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleótilo (CC), comprimento de raiz (CR), em cm, número de raiz (NR), teor de ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) em mg Kg^{-1} , de 12 genótipos de arroz irrigado avaliados nos tratamentos controle (T1) e de estresse por excesso de ferro (T2), em solução hidropônica. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

Variáveis	CPA	CC	CR	NR	Fe	Cu	Zn	Mn
CPA	1	0,23*	0,043	0,48*	-0,15	0,05	-0,18	-0,08
CC		1	0,26*	0,09	-0,19	-0,14	-0,26*	-0,18
CR			1	0,23*	-0,39*	-0,06	-0,36*	-0,44*
NR				1	-0,39*	0,02	-0,37*	-0,37*
Fe					1	0,009	0,94*	0,88*
Cu						1	0,19	0,22
Zn							1	0,89*
Mn								1

* Significante ao nível de 0,05 de probabilidade (teste F).

As variáveis que apresentaram maior correlação significativa positiva foram teor de Fe com Zn (0,94) e Mn (0,88), seguidas pela correlação entre Zn e Mn que foi de 0,89, concordando com os resultados obtidos por Bresolin (2011), onde foram observadas alterações conjuntas nas variáveis teor de Fe, Zn e Mn.

De acordo com Fageria (2002), as interações podem variar de nutriente para nutriente, entre as espécies e, até mesmo, entre cultivares da mesma espécie. Por esta razão, o assunto é muito complexo e, até os dias atuais, não estão bem elucidados nas culturas anuais.

Desbalanços nutricionais, decorrentes da interação do Zn com outros nutrientes, tem sido relatados na literatura, a exemplo: Zn x N (MARSCHNER, 1995); Zn x Ca (BARBOSA FILHO et al., 1992, FURLANI et al., 2005); Zn x Mg (MONNET et al., 2001); Zn x B (NABLE et al., 1997); Zn x Cu (LUO; RIMMER, 1995); Zn x Fe (PAULA et al., 1999); e Zn x Mn (MONNET et al., 2001).

Esta ocorrência simultânea de Fe e Zn apresentada neste trabalho pode indicar que esses dois micronutrientes sejam transportados para o tecido através dos mesmos mecanismos, uma vez que existem transportadores de Fe que são capazes de transportar Zn (GUERINOT, 2000; SCHAAF et al. 2005), o que poderia explicar, em parte, alocação simultânea dos dois metais.

As respostas referentes às variáveis teor de Fe, Zn e Mn apresentaram correlação negativa significativa com CR (-0,39, -0,36, -0,44) e com NR (-0,39, -0,37, -0,37), demonstrando que o acúmulo de Fe, Zn e Mn nos tecidos acarreta redução nos índices destas variáveis (Tabela 4).

Outras correlações positivas significativas obtidas foram de CPA com CC e NR, CC com CR. Ao contrário, a variável Zn apresentou correlação significativa negativa de -0,26 com CC. O mesmo foi observado para o Mn com CR (-0,49) (Tabela 4).

De modo geral, a análise de correlação entre as variáveis empregadas evidenciou elevada correlação positiva entre Fe, Zn e Mn. Também demonstrou que o aumento do acúmulo destes micronutrientes nos tecidos de plântulas de arroz sob condição de excesso de ferro acarreta redução do CR e do NR.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a caracterização de plantas quanto à tolerância a toxidez por ferro, além de permitir a recomendação de cultivares adaptadas a esta condição de cultivo, também podem contribuir para o aumento da compreensão de como as plantas podem se adaptar a essas condições de estresse, tornando possível a identificação de genes responsáveis pelo

transporte destes íons, melhorando substancialmente a compreensão da homeostase dos metais em plantas (BRESOLIN, 2011).

Portanto, a seleção de genótipos para determinados caracteres pode ser feita indiretamente através da análise de variáveis de fácil mensuração, desde que apresentem correlações significativas (BENIN et al., 2003). Assim, se existir correlação significativa entre CR e NR com outra variável, seria possível a identificação de genótipos tolerantes. O comportamento dos genótipos classificados por meio de avaliações visuais quanto à tolerância e sensibilidade a toxidez por ferro são apresentados na Tabela 5. Os sintomas visuais foram baseados nas reações de morte das folhas e intensidade de amarelecimento das mesmas, em comparação com as testemunhas conforme descrito por Bacha (1993), com adaptações, tendo em vista que os sintomas detectados neste estudo foram sintomas iniciais de toxidez direta e não indireta como relatado pelo autor.

As plantas submetidas à condição de toxidez por ferro apresentaram folhas com coloração castanha (amarelo queimado), pontuações de coloração castanha ao longo de toda a folha, além de extremidades superiores das folhas com aparência de queimado (seca). De acordo com estes sintomas visuais, os genótipos foram classificados quanto à tolerância a toxidez por ferro sob condição hidropônica (Tabela 5).

Tabela 5. Sintomas visuais avaliados em 12 genótipos de arroz irrigado sob o tratamento de estresse por ferro (T2), em solução hidropônica. As graduações obedecem a uma escala variável de 0 a 9, adaptada do Standard Evaluation System for Rice utilizada pelo IRRI. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

Genótipo	Nota	Classificação
Epagri 108	2	T
BR-IRGA 409	9	S
BRS7- Taim	7	S
CGF-Z-M9- 204	8	S
CGF-Z-M9- 303CD	5	MT
CGF-Z-M9- 328	4	MT
CGF-Z-M9- 243	5	MT
CGF-Z-M9- 192	7	S
CGF-Z-M9- 22P	6	S
CGF-Z-M9- 53	6	S
CGF-Z-M9- 444CD	3	T
CGF-Z-M9- 65	8	S

Classificação quanto ao nível de tolerância a toxidez por ferro. T (tolerante 0-3), MT (moderadamente tolerante 4-5) e S (sensível 6-9).

Os mesmos genótipos classificados como sensíveis a toxidez por ferro, apresentaram os sintomas mais evidentes de toxidez através da análise visual, estes genótipos também apresentaram maior acúmulo de ferro na parte aérea das plântulas.

4.4 Conclusões

As cultivares BR-IRGA 409 são sensíveis à toxidez por ferro e apresentam grande acúmulo de Fe^{2+} na parte aérea.

As famílias de mutantes de arroz CGF-Z-M9-444CD (T), CGF-Z-M9-328 (MT) e CGF-Z-M9-243 (MT), são tolerantes ao estresse por toxidez de ferro.

A família CGF-Z-M9-444CD, um dos mutantes que menos acumulou ferro nos tecidos sob condição de estresse, também é tolerante na análise visual.

As variáveis CR, NR, Fe, Zn e Mn, são responsivas na caracterização ao estresse por ferro em condições hidropônicas.

4.5 Referências

AHLOOWALIA, B.S.; MALUSZYNSKI, M. Induced mutations: a new paradigm in plant breeding. **Euphytica**, v.11, n. 8, p. 167-173, 2001.

ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Rice and *Phragmites*: effects of organic acids on growth, root permeability, and radial oxygen loss to the rhizosphere. **American Journal of Botany**, v.88, p.1359-1370, 2001.

ASCH, F.; BECKER, M.; KPONGOR, D. S. A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.168, n.6, p.764-773, 2005.

AUDEBERT, A.; SAHRAWAT, K. L. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 23, p.1877-1885, 2000.

BACHA, R. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. 19, 1993. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camboriú. **Anais**. Florianópolis: EMPASC, 1993. p.156-159.

BARBOSA FILHO, M. P. et al. Interação entre calagem e zinco na absorção de nutrientes e produção de arroz de sequeiro em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 355-360, 1992.

BENCKISER, G.; OTTOW, J. C. G.; SANTIAGO, S.; WATANABE, I. Physiochemical characterization of iron-toxic soils in some Asian countries. IRRI research paper series 85. **The International Rice Research Institute**, Los Banos, The Philippines. 1982.

BENIN, G.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; ASSMANN, I.C.; FLOSS, E.L.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V.S.; SILVA, J.G. Implicações do ambiente sobre o rendimento e suas influências sobre estimativas de parâmetros genéticos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.3, p.207-214, 2003.

BRAMMER, S.P. **Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento**. Passo Fundo, Embrapa Trigo. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 2009. 365p.

BRESOLIN, A.P.S. **Caracterização morfológica e análise da expressão gênica em arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse por ferro**. 2011. 143f. Tese (Doutorado - Fitomelhoramento). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos** (Julho), Brasília. 2011. 42 p.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. Rice: Nutrient disorders and nutrient management. **The International Rice Research Institute**, Manila, Philippines. 2000.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants**, Sunderland: Sinauer Associates, 392 p. 2004.

FAGERIA, N. K. Resposta de arroz de terras altas à correção de acidez em solo de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 11, p. 2303-2307, 2000.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; CLARK, R. B. Micronutrients in crop production. **Advances in Agronomy**, New York, v. 77, n. 1, p. 189-272, 2002.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; JONES, C. A. **Growth and mineral nutrition of field crops**. 2. ed. New York: M. Dekker, 1997.

FREITAS, F. A. **Dissimilaridade genética em arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à toxicidade ao alumínio**. 2003. 69f. Dissertação (Mestrado - Ciência e Tecnologia de Sementes). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

FURLANI, A. M. C. et al. Eficiência de cultivares de milho na absorção e utilização de zinco. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 264-273, 2005.

GUERINOT, M.L. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.190-198, 2000.

INTERNATIONAL RICE - RESEARCH INSTITUTE. **Standard evaluation system for rice**. Los Banos, IRRI, 1975.

KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. Encarte técnico. **Informações Agronômicas**. Piracicaba, nº 118, p. 12-15, Jun. 2007.

KOPP, M.M. **Resposta de genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) ao estresse por ácidos orgânicos sob condições de ambiente controlado**. Tese (Doutorado - Fitomelhoramento). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 120f. 2008.

LUO, Y. M.; RIMMER, D. L. Zinc copper interaction affecting plant-growth on a metal-contaminated soil. **Environmental Pollution**, London, v. 88, n. 1, p. 79-83, 1995.

MALUSZYNSKI, M. Crop germoplasm enhancement through mutation techniques. In: Rutger JN, ROBINSON J.F.; DILDAY, R.H. (eds.) **Proceedings of the International Symposium on Rice Germplasm Evaluation and Enhancement**. Arkansas, USA. 1998.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5.ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.

MONNET, F. et al. Relationship between PSII activity, CO₂ fixation and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. **Journal of Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 9, p. 1137-1144, 2001.

NABLE, R. O.; BAÑUELOS, G. S.; PAULL, J. G. Boron toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 193, n. 1/2, p. 181-198, 1997.

PAULA, M. B. et al. Curva de resposta e avaliação de extratores para zinco disponível em solos hidromórficos e aluviais sob arroz inundado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 15, n. 1, p. 49-55, 1999.

PIMENTEL, M.C.G. **Indução de aberrações cromossômicas estruturais em milho (*Zea mays* L.) por radiação gama**. 1990. 131f. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, UFV, Viçosa, MG.

RATERING, S.; SCHNELL, S. Localization of iron-reducing activity in paddy soil by profile studies. **Biogeochemistry**, v. 48, p.341–365, 2000.

SAHRAWAT, K. L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **Journal Plant Nutrition**, v.27, p.1471-1504, 2004.

SAHRAWAT, K. L.; DIATTA, S. Nutrient management and season affect soil iron toxicity, in West Africa Rice Development Association: **Annual Report**, 1995, p. 34–35.1996.

SICHUL, L.; GYNHEUNG, A. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice. **Plant Cell and Environment**, v.32, p.408–441, 2009.

SCHAAF, G.; LUDEWIG, U.; ERENOGLU, B.E.; MORI, S.; KITAHARA, T.; VON WIRÉN, N. ZmYs1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore and nicotamine chelated metals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 9091-9096, 2004.

SILVEIRA, V. C. DA.; OLIVEIRA, A. P. DE.; SPEROTTO, R. A.; LUCIANA S. ESPINDOLA, L. S.; AMARAL, L.; DIAS, J. F.; CUNHA, J. B. DA.; FETT, J. P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.2, p.127-139, 2007.

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, 2010. 164 p.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002. 86p.

STEIN, R. J.; DUARTE, G. L.; SPOHR, M.G.; LOPES, S. I. G.; FETT, J. P. Distinct physiological responses of two rice cultivars subjected to iron toxicity under field conditions. **Annals of Applied Biology**, v.154, p.269-277, 2009.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, planta e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995. 174p. (Boletim técnico, n.5).

WARDA. **Annual Report**. West Africa Rice Development Association, Bouake, Côte d'Ivoire. 2001.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. **Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice**. The international rice research institute (IRRI). Los Baños, Laguna, Philippines. 1976.

ZIMMER, P.D.; MATTOS, L.A.T.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.; KOPP, M.M.; FREITAS, F.A. Identification of rice mutants (*Oryza sativa* L.) for agronomical and root system traits. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, p.195-199, 2003.

5. CAPITULO IV

VARIABILIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE ARROZ IRRIGADO UTILIZANDO AS TÉCNICAS IRAP E REMAP

5.1 Introdução

Tradicionalmente os programas de melhoramento genético realizam cruzamentos entre cultivares elite com caracteres agronômicos de interesse, por meio de associação fenotípica, o que provoca uma padronização no fenótipo, em virtude da redução da variabilidade genética para estes caracteres. Isto dificulta identificar a variabilidade genética em indivíduos dentro de um germoplasma. Sendo assim, estudos sobre a estimativa das diferenças genéticas entre indivíduos ou entre populações nas espécies vegetais através de marcadores moleculares tem sido de grande importância em programas de melhoramento, pois fornecerem parâmetros para o conhecimento da variabilidade genética entre os genótipos analisados possibilitando o monitoramento de bancos de germoplasma (CRUZ; CARNEIRO, 2003), pois geram informações úteis para conservação e uso dos acessos (TOQUICA et al., 2003).

O conhecimento prévio do grau da distância genética entre os acessos permite identificar genitores com maiores diferenças, em nível de DNA, o que possivelmente resulta no incremento da recombinação nas progênes segregantes, consequentemente aumentando os ganhos genéticos com a seleção. Em teoria, quanto maiores as diferenças genéticas entre os genitores, maiores são as possibilidades de ocorrência de segregantes transgressivos dentro de um cruzamento.

Os descritores morfológicos são o “cartão de apresentação” de uma nova variedade. Estes possuem um papel fundamental na divulgação das características agrônômicas de novas cultivares e podem influenciar na escolha destas por parte de agricultores.

Alguns autores compararam a eficiência de diferentes tipos de marcadores (morfológicos, genealogia, isoenzimas e marcadores de DNA) nas estimativas de variabilidade genética no arroz cultivado (MACKILL et al., 1996; CAO et al., 1997; FUENTES et al., 1999; DAVIERWALA et al., 2000; VIRK et al., 2000; QIAN et al., 2001; LOPES, 2002). De modo geral, os autores relatam que os marcadores moleculares são mais eficientes que os marcadores morfológicos para avaliar a variabilidade genética, pois muitas vezes os caracteres morfológicos, sofrem ação do ambiente. Marcadores de DNA não sofrem ação do ambiente, tornando a mensuração mais precisa. Sendo assim torna-se importante o conhecimento de técnicas de marcadores moleculares eficazes e de baixo custo.

O genoma do arroz apresenta vários elementos de transposição (TEs). Eles caracterizam-se como segmentos de DNA que possuem a capacidade de catalisar seu próprio movimento ou fazer auto-cópias e inserir-se em novas regiões no genoma. Muitos desses elementos ocorrem em grandes quantidades nas diferentes regiões do genoma, contribuindo assim, para a variação genética, por aumentar o tamanho e produzir mutações dentro dos genes ou em regiões intergênicas (AGRAWAL et al., 2001).

Os TEs compõem uma grande fração do genoma de eucariotos. Eles são particularmente abundantes nas plantas, onde muitas vezes são um dos principais componentes do DNA. Representam uma fração de 50% a 80% nas gramíneas, como no milho e no trigo (FLAVELL, 1986; SAN MIGUEL et al., 1996; SAN MIGUEL; BENNETZEN, 1998; KUMAR; BENNETZEN, 1999; KUMAR; HIROCHIKA, 2001). Estes elementos apresentam-se em alto número de cópias e são dispersos nos cromossomos, o que os torna, em especial os que possuem sequências repetidas nas suas extremidades, ideais para a utilização como marcadores moleculares (KALENDER et al., 1999; TÉO et al., 2005; KALENDER; SCHULMAN, 2006; NATALI et al., 2007).

Os TEs podem ser agrupados hierarquicamente em classes, subclasses, ordens, superfamílias, famílias e subfamílias, de acordo com algumas características (WICKER et al., 2007).

Os TEs podem ser classificados em duas grandes classes, dependendo do mecanismo de transposição (GOODIE; KAZAZIAN, 2008); que pode ser por meio de DNA (classe II) ou através de um intermediário de RNA (classe I). Os TEs classe II, comumente conhecidos como transposons, se deslocam a partir de seqüências de DNA e para tal codificam uma proteína chamada transposase (enzima que catalisa sua saída da região original e inserção em novos sítios). TEs classe I, denominados como retrotransposons, movem-se via RNA e, para tanto, codificam transcriptases reversas que utilizam sua seqüência como molde para fazer uma fita de RNA que serve como molde para posteriormente dar origem a uma fita de DNA que será inserida numa outra região do genoma (RANGNER, 1996, NELLAKER et al., 2012). Três por cento do genoma humano consiste de elementos transponíveis classe II (DNA) (LANDER et al., 2001), embora estas seqüências são encontradas muito menos abundante do que os elementos transponíveis da classe I (RNA) (DE KONING et al., 2011).

Os elementos da Classe I (retrotransposons) possuem um mecanismo replicativo de transposição, que produz como resultado de sua atividade um aumento no seu número de cópias e, concomitantemente, um aumento no tamanho do genoma hospedeiro (SAN MIGUEL; BENNETZEN, 1998). Os retrotransposons podem ou não possuir longas terminações repetidas (LTRs - *long terminal repeat*). Nos retrotransposons, as LTRs localizam-se em suas extremidades e são subdivididas nas regiões U3 (3' RNA), R (RNA repetido) e U5 (5' RNA). Os sinais regulatórios dos retrotransposons tais como o da região promotora de transcrição, regiões de término de transcrição e os locais da poliadenilação estão localizados nas LTRs (KUMAR; BENNETZEN, 1999).

Sendo assim, marcadores de DNA baseados em retrotransposons compõem um grupo de marcadores moleculares utilizados para a identificação e descrição de genótipos, bem como para caracterizar a variabilidade genética entre indivíduos e/ou populações, graças a sua grande dispersão cromossômica, número de cópias variável e distribuição aleatória no genoma (KUMAR et al., 1997; KALENDAR et al., 1999).

A disponibilidade de genomas seqüenciados e o crescente aumento de bancos de dados, incluindo muitas seqüências de elementos de transposição possibilitaram o desenvolvimento de várias técnicas para estudo de diferenças dos

genomas de várias espécies, com base nas mudanças destes elementos (JANICKI et al., 2011).

A técnica IRAP (*Inter - Retrotransposon Amplified Polymorphism*) revela o polimorfismo existente entre dois retrotransposons dispostos em qualquer orientação no genoma (KALENDAR et al., 1999, PRICE et al., 2003), que acontecem ao acaso, podendo ocorrer em sentidos opostos (3' – 5' ou 5' – 3'). A análise é baseada na utilização de dois *primers*, sendo cada um deles desenhado para ligar na região LTR (*long terminal repeat*) de um TE. Numa reação de PCR, um *primer forward* liga-se na LTR de um TE e um *primer reverse* liga-se na LTR de um segundo TE e posteriormente a Taq DNA *polimerase*, amplifica a região contida entre estes dois *primers* gerando um *amplicon*. Diferenças nos tamanhos dos *amplicons* e no número de *amplicons*, obtidos nos diferentes indivíduos analisados são utilizados para mensurar as diferenças entre os indivíduos.

A técnica REMAP (*Retrotransposon - Microsatellite Amplified Polymorphism*), surgiu da combinação das técnicas de IRAP e de marcadores SSR, pois implica na utilização de um *primer* que liga-se numa seqüência repetitiva simples (SSR) e um outro *primer* numa seqüência LTR, assim explora o polimorfismo das regiões amplificadas entre as seqüências de microssatélites e Retrotransposons aleatoriamente adjacentes (KALENDAR et al., 1999).

A aplicação da técnica IRAP (*Inter - Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e/ou da técnica REMAP (*Retrotransposon - Microsatellite Amplified Polymorphism*) tem se apresentado uma excelente opção como marcador molecular (KALENDAR et al., 1999; VICIENT et al., 2001), para mapeamento de genes de resistência em cereais (MANNINEN et al., 2000; BOYKO et al., 2002) estudos de filogenia e na detecção da variabilidade genética dentro de vários gêneros de plantas: *Hordeum vulgare* L. (KALENDAR et al., 1999), *Citrus clementina* Hort. (BRETO et al., 2001), *Spartina anglica* C.E Hubbard (BAUMEL et al., 2002), *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla (TEO et al., 2005), *Diospyros kaki* Thunb. (GUO et al., 2006), *Pisum sativum* L. (SMYKAL, 2006), *Oryza sativa* L. (CASTELO BRANCO et al., 2007), *Aegilops tauschii* (Coss.) Schmalh (SAEIDI et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi analisar a distância genética entre 20 genótipos de arroz, com o intuito de avaliar o potencial da utilização das técnicas de marcadores IRAP e REMAP.

5.2 Material e Métodos

Genótipos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF), pertencente ao Departamento de Fitotecnia, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, localizado no município do Capão do Leão/RS. Foram utilizados 20 genótipos de arroz no sistema irrigado (Tabela 1), da coleção de trabalho de arroz da Embrapa Clima Temperado.

Tabela 1. Genótipos utilizados para análise da distância genética. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

Genótipos	Grupo
1- BRS Bojuru	<i>Japonica Temperada</i>
2- BRS Querência	<i>Japonica Tropical</i>
3- BRS Firmeza	<i>Japonica Tropical</i>
4- BRS7 Taim	<i>Indica</i>
5- BRS Fronteira	<i>Indica</i>
6- CS BRS 113 TioTaka	<i>Indica</i>
7- Irga 421	<i>Indica</i>
8- Irga 417	<i>Indica</i>
9- BR Irga 409	<i>Indica</i>
10- Epagri 109	<i>Indica</i>
11- BRS Atalanta	<i>Indica</i>
12- BRS Alvorada	<i>Japonica Tropical</i>
13- BRS Tropical	<i>Japonica Tropical</i>
14- BRS Aroma	<i>Japonica Tropical</i>
15- BRS Formoso	<i>Japonica Tropical</i>
16- IAS12 9 Formosa	<i>Japonica Temperada</i>
17- Amaroo	<i>Japonica Tropical</i>
18- Bluebelle	<i>Japonica Tropical</i>
19- EEA 406	<i>Japonica Tropical</i>
20- Carnarolli	<i>Japonica Tropical</i>

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras foliares de cada genótipo, por meio do método de extração CTAB modificado (SAGHAI-MARROF, 1984). A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo, onde a concentração de DNA foi estimada através do padrão de comparação conhecido do marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen – Life Technologies), e as respectivas diluições foram realizadas para padronizar a concentração final em aproximadamente 50 ng μ^{-1} .

Reação de PCR de IRAP e REMAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorfism e Retrotransposon Microsatélite Amplified Polimorfism)

As reações de amplificação (PCR) foram realizadas de acordo com a técnica IRAP e REMAP, segundo protocolo proposto por Kalendar et al. (1999), utilizando dois *primers* da região do elemento transponível *TOS17*, quatro *primers* que anelam nas regiões terminais (LTR - *Long Terminal Repeats*) de Retrotransposons *TOS 17*, sintetizados a partir da descrição de suas seqüências (HIROCHIKA et al., 1996), oito *primers* do retrotransposon *ping pong*, e 28 *primers* específicos de regiões SSR (Tabela 2). Sendo assim, as combinações destes *primers* possibilitaram a formação de 339 combinações de marcadores (Apêndice B).

Inicialmente foi feito a avaliação das 339 combinações de *primers* com 4 genótipos de arroz, no intuito de testar as amplificações e selecionar as melhores combinações, ou seja, que apresentaram melhor perfil polimórfico (Figura 1).

As amplificações de PCR foram realizadas numa reação contendo *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) a partir do protocolo indicado pelo fabricante. O programa de amplificação utilizado foi do tipo “*touchdown*”, que consistiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos compostos de 94°C por 1 minuto de desnaturação. O anelamento foi obtido com decréscimo de 1°C na temperatura a cada ciclo (no intervalo de 62°C até 55°C) e a extensão se deu a 72°C por 1 minuto. Após a amplificação, foi feito a extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da reação foram separados através de eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados mediante coloração com brometo de etídeo.

Tabela 2. Lista de *Primers* para análise de distância genética. CGF/FAEM/UFPeI, 2012.

Elemento Transponível	Sequência (5' – 3')
TOS17_F	GCTTTTCTTCATGGTGA
TOS17_R	CACGGGAGGAAGTATGA
LTR_1	TTGGATCTTGTATCTTGTATATAC
LTR_2	GCTAATACTATTGTTAGGTTGCAA
LTR_3	CCAATGGACTGGACATCCGATGGG
LTR_4	CTGGACATGGGCCAACTATACAGT
PING1_F	GTCACAATGGGGGTTTCACT
PING1_R	GGCCAGTCACAATGGCTAGT
PING2_F	CTACGGAGTACACCGCAACC
PING2_R	AATGGATTGCCTACTGCTGACT
PONG1_F	AACGAGGCTTCTGACCATCG
PONG1_R	CAGGTTCTGAACGGTTGAT
PONG2_F	GGGGTGAAACAGCATTGAGA
PONG2_R	TGTGGTTGCAAAGACCA
SSR	Sequência (5' – 3')
(TA) ₂₅ A	TATATATATATATATATATATATA <u>A</u>
(TA) ₂₅ T	TATATATATATATATATATATATA <u>T</u>
(TA) ₂₅ C	TATATATATATATATATATATATA <u>C</u>
(TA) ₂₅ G	TATATATATATATATATATATATA <u>G</u>
(CT) ₂₅ A	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTA <u>A</u>
(CT) ₂₅ T	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT <u>T</u>
(CT) ₂₅ C	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT <u>C</u>
(CT) ₂₃ G	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT <u>G</u>
(GA) ₂₃ A	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAA <u>A</u>
(GA) ₂₃ T	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAT <u>T</u>
(GA) ₂₃ C	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAC <u>C</u>
(GA) ₂₃ G	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG <u>G</u>
(CGC) ₁₆ A	CGCCGCCGCCGCCGCA <u>A</u>
(CGC) ₁₆ T	CGCCGCCGCCGCCGCT <u>T</u>
(CGC) ₁₆ C	CGCCGCCGCCGCCGCC <u>C</u>
(CGC) ₁₆ G	CGCCGCCGCCGCCGCC <u>G</u>
(GCG) ₁₆ A	GCGGCGGCGGCGGCGA <u>A</u>
(GCG) ₁₆ T	GCGGCGGCGGCGGCGT <u>T</u>
(GCG) ₁₆ C	GCGGCGGCGGCGGCGC <u>C</u>
(GCG) ₁₆ G	GCGGCGGCGGCGGCGG <u>G</u>
(CGG) ₁₆ A	CGGCGGCGGCGGCGGA <u>A</u>
(CGG) ₁₆ T	CGGCGGCGGCGGCGGT <u>T</u>
(CGG) ₁₆ C	CGGCGGCGGCGGCGGC <u>C</u>
(CGG) ₁₆ G	CGGCGGCGGCGGCGGG <u>G</u>
(CCG) ₁₆ A	CCGCCGCCGCCGCCGA <u>A</u>
(CCG) ₁₆ T	CCGCCGCCGCCGCCGT <u>T</u>
(CCG) ₁₆ C	CCGCCGCCGCCGCCGC <u>C</u>
(CCG) ₁₆ G	CCGCCGCCGCCGCCGG <u>G</u>

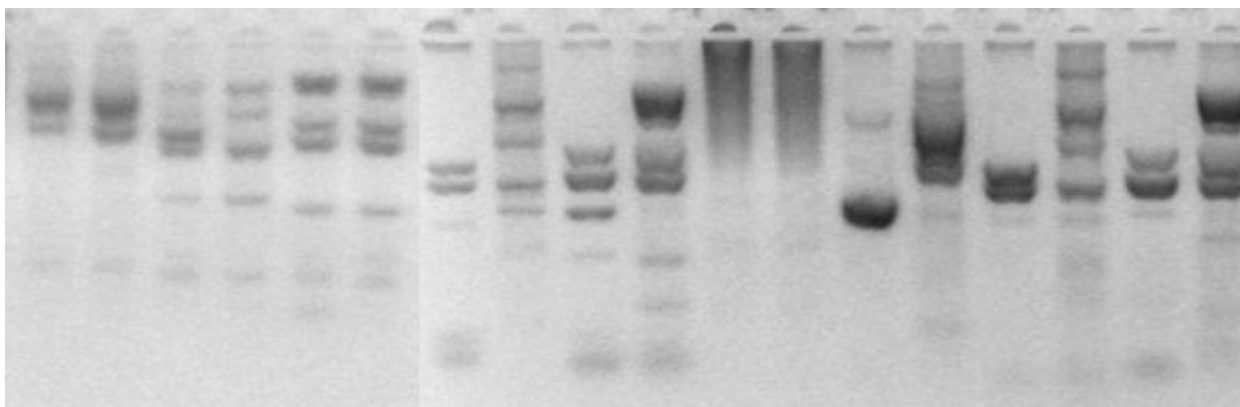


Figura 1. Perfil do padrão de bandas obtido, em gel de agarose (2%), referente as combinações de *primers* que foram seleccionadas. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

A seleção das combinações com perfil mais polimórfico resultou na escolha de 83 combinações, estas foram testadas em gel de poliacrilamida 6% e visualizadas mediante coloração com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001) (Figura 2).



Figura 2. Perfil do padrão de bandas obtido, em gel de acrilamida (6%), referente as 83 combinações de *primers* testadas. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

Posteriormente, através de um novo *screening* que foi feito, com o objetivo de obter um menor número de marcadores e que estes fossem eficientes para explicar a variabilidade existente entre os genótipos analisados, foram selecionadas destas 83 combinações, sete combinações de *primers* (Tabela 3).

Tabela 3. Combinações de *primers* selecionados para análise de distância genética. CGF/FAEM/UFPel, 2012.

Primer Retrotransposon	Primer SSR
PING1_F GTCACAATGGGGGTTTCACT	(GA) ₂₃ C GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAC
PING2_R ATGGATTGCCTACTGCTGACT	(CT) ₂₃ G CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTG
PONG1_F AACGAGGCTTCTGACCATCG	(GA) ₂₃ C GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAC
PING1_F GTCACAATGGGGGTTTCACT	(CT) ₂₃ T CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTT
PING2_F CTACGGAGTACACCGCAACC	(CGC) ₁₆ T CGCCGCCGCCGCCGCT
PING2_R ATGGATTGCCTACTGCTGACT	(CGC) ₁₆ A CGCCGCCGCCGCCGCA
PONG1_F AACGAGGCTTCTGACCATCG	(GA) ₂₃ C GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAC

Análise dos dados

A análise dos produtos da amplificação foi feita classificando os fragmentos independentemente conforme presença (1) e ausência (0) de cada fragmento amplificado em diferentes alturas do gel de poliacrilamida (possivelmente os diferentes locos e/ou diferentes alelos amplificados). Os escores (0 e 1) foram utilizados na construção de uma matriz de dados binários. Para o cálculo de similaridade genética entre todos os pares de indivíduos, foi utilizado o programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000). Para calcular os valores de similaridade foi adotado o Coeficiente de Coincidência Simples (*“simple matching”*) definido pela relação $S = (a+d)/(a+b+c+d)$, onde o numerador representa o somatório das concordâncias positivas e negativas, e o denominador, o somatório das concordâncias e discordâncias entre bandas (SOKAL; MICHENER, 1958). Foi obtido o coeficiente de dissimilaridade ($D = 1 - \text{similaridade}$), a partir do complemento aritmético da similaridade.

A partir da matriz de dissimilaridade foi construído um dendrograma por meio do método de agrupamento hierárquico (UPGMA -*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (ROHLF, 1963; SNEATH; SOKAL, 1973). O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o respectivo dendrograma, ou seja, o grau de

concordância entre a matriz de dissimilaridade e o agrupamento formado foi estimado através do coeficiente de correlação cofenética (r), de acordo com o teste de Mantel (MANTEL, 1962) utilizando 1000 permutações, realizados no programa NTSYS v 2.1. (ROHLF, 2000).

A estabilidade estatística do agrupamento foi estimada por meio da análise de *bootstrapping* com 1000 replicações, através do programa de computador WINBOOT Ver. 1.0 (YAP; NELSON, 1996).

Resultados e Discussão

A partir da seleção realizada para obtenção das combinações de *primers*, foi possível identificar que as melhores combinações, ou seja, aquelas que obtiveram o melhor nível polimórfico e que foram mais eficientes para discriminar os genótipos pertencem a técnica REMAP.

Sendo assim, das análises que foram realizadas com as sete combinações de *primers* REMAP, foram obtidos um total de 144 fragmentos de DNA, sendo destes 107 polimórficos e 37 monomórficos. Do total de fragmentos analisados 74,3% foram polimórficos no mínimo entre 2 genótipos analisados.

A técnica de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA permitiu a formação de um dendrograma (Figura 3), com um adequado ajuste entre as distâncias apresentadas graficamente e a matriz original de distâncias (coeficiente de correlação cofenética (r) de 0,91), atribuindo confiabilidade à análise. Valores superiores a 0,70 podem ser considerados eficientes na representação gráfica de distâncias genéticas (ROHLF 2000; MEYER 2002; VIEIRA et al., 2007).

A dissimilaridade genética variou numa amplitude de 0,06 até 0,27, com distância genética média de 0,21 (Tabela 3).

Com base na média das distâncias, o dendrograma demonstra a separação dos genótipos em três grupos distintos, o agrupamento I foi formado pelas cultivares BRS Bojuru e BRS Firmeza, ambas pertencentes a subespécie *japonica*, com dissimilaridade de 0,19, e *bootstrapping* de 61,7%. Estes genótipos apresentam comportamento semelhante frente a alguns estresses, como: tolerância a salinidade, a brusone, ao ferro e ao frio na fase reprodutiva.

O grupo II foi composto por seis cultivares: BRS Aroma, IAS12 9 Formosa, Amaro, Bluebelle, EEA 406 e Camarolli, esse grupo também é formado somente por cultivares da subespécie *japonica*. Ainda dentro deste grupo foi possível verificar

a formação de um subgrupo, com valor de *bootstrapping* de 59,6% composto por genótipos Amaroo (genótipo australiano de grão intermediário) e Bluebelle (genótipo americano de grão longo - fino), ambas de ciclo precoce.

No grupo III, houve a formação de um aglomerado de 12 cultivares, sendo a maioria destas pertencentes a subespécie *indica* e ao grupo das cultivares modernas, ou seja, que possuem porte baixo, grande número de afilhos, resistência ao acamamento e grãos com ótimo rendimento industrial. Apesar da estreita base genética do arroz, vários trabalhos citam que há maior variabilidade genética dentro da subespécie *indica* (GHAREYAZIE et al., 1995; MACKILL, 1995; ZHANG et al., 1996; CAO et al., 1997; ZHU et al., 1998; SUN et al., 2001; LOPES, 2002).

Além disso, dentro deste grupo foi possível observar a formação de alguns subgrupos, indicando quais genótipos são mais parecidos dentro do grupo III. O subgrupo IIIa, foi formado pelas cultivares BRS 7 Taim e BRS Fronteira, o grupo IIIb pelas cultivares IRGA 417 e BR IRGA 409 e o subgrupo IIIc pelas cultivares BRS Alvorada e SCSBRS113 Tio Taka.

A dissimilaridade muito pequena (0,06), das cultivares que compõem o subgrupo IIIa (BRS7 Taim e BRS Fronteira) pode estar relacionada ao fato dessas cultivares realmente apresentarem muitas características iguais, isto é, pertencerem ao grupo *indica*, apresentarem grãos do tipo longo-fino, de casca lisa, com ciclo médio e boa produtividade.

Também a dissimilaridade (0,07) muito pequena entre as cultivares do subgrupo IIIb (IRGA 417 e BR IRGA 409) concorda com o fato da cultivar IRGA 417 apresentar em sua genealogia a cultivar IRGA 409 como um dos seus genitores, além disso essas cultivares apresentam porte baixo, sensibilidade a toxidez por ferro, grão do tipo longo – fino e alto teor de amilose.

Por fim, o subgrupo IIIc (BRS Alvorada e SCSBRS113 Tio Taka), apresenta duas cultivares de ampla adaptação, recomendadas para o cultivo em várzeas da região do Nordeste do Brasil, mas que diferem quanto a subespécie a BRS Alvorada é uma cultivar pertencente a subespécie *japonica* e a SCSBRS113 Tio Taka pertence a subespécie *indica*, oriunda de seleção recorrente.

[illegible]

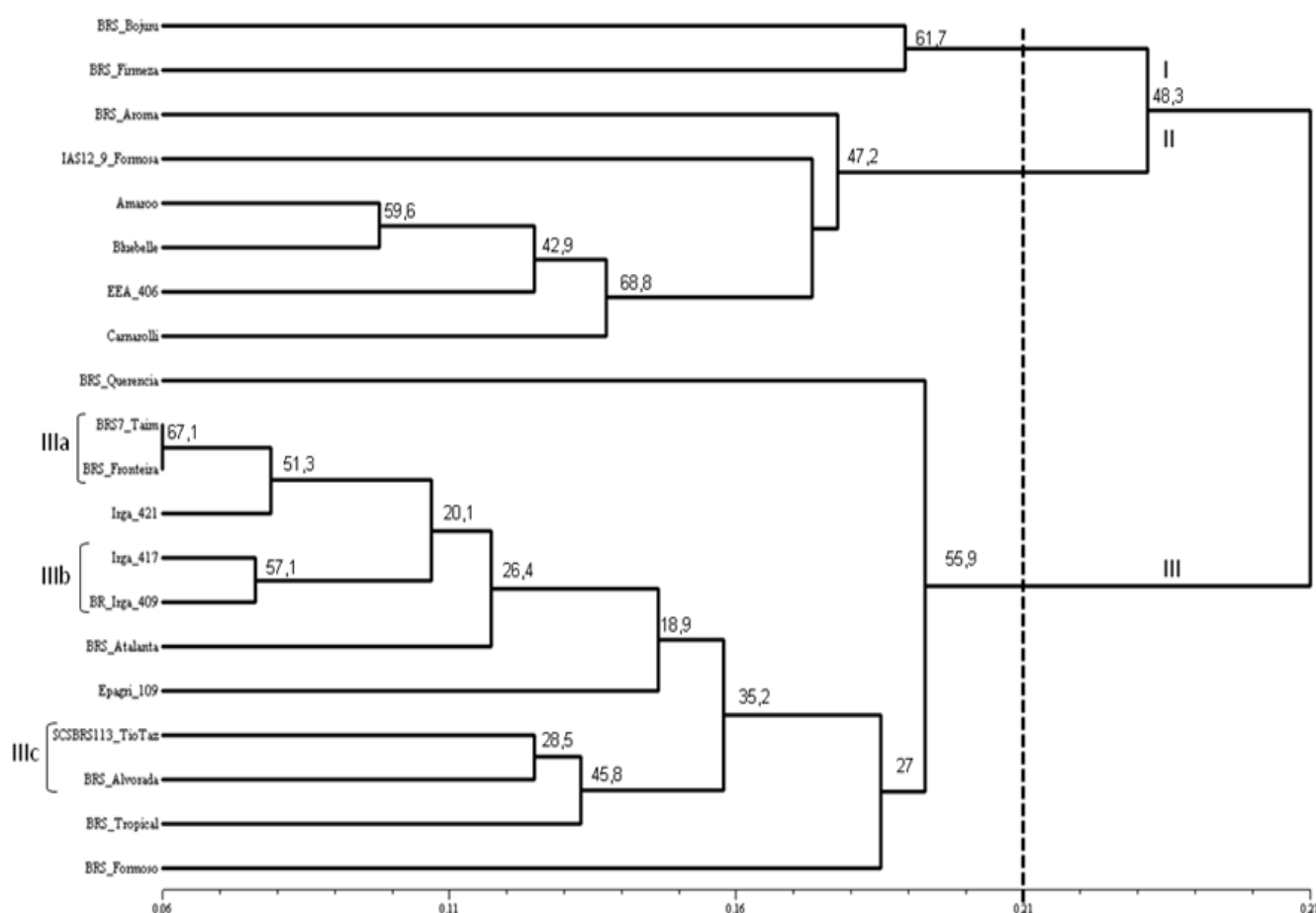


Figura 3. Dendrograma de 20 genótipos de arroz irrigado obtido a partir da análise de REMAP utilizando o índice de coincidência simples (*“simple matching”*) e o método de agrupamento UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos se agruparam em 1000 ciclos de análise de *bootstrapping* utilizando o programa WINBOOT. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,90. CGF/FAEM/UFPEL, 2012.

Um bom sistema de marcadores moleculares é aquele que apresenta um conjunto de alelos polimórficos para n locos entre n indivíduos comparados. Se os sete conjunto de *primers*, utilizados neste estudo, tivessem sido diferentes para os n locos aleatórios entre cada par de genótipos (isto porque boa parte dos locos amplificados com base em LTRs podem ter distribuição ao acaso em cada genoma), seria obtida uma medida de dissimilaridade (distância) igual a um ($D_{\text{Genótipo1 vs Genótipo2}} = 1$), isto é, o numero de *amplicons* e/ou todos os *amplicons* com tamanhos diferentes entre dois genótipos comparados.

Entretanto, neste estudo, a dissimilaridade máxima obtida foi de 0,343 (BRS Bojuru VS BRS Tropical), mostrando que entre os dois genótipos mais diferentes,

apenas 1/3 dos locos amplificados foram diferentes entre si. Analisando a distância média gerada pelo sistema (0,21) é possível prever que na média apenas 1/5 dos *amplicons* são diferentes entre todos os genótipos.

Apesar do resultado ter agrupado os genótipos analisados em três grupos e subgrupos (com base na distância média), que mantem harmonia com as diferenças *per se* previamente conhecidas para estes genótipos (como subespécie, origem dos cruzamentos e características agronômicas), os valores das distâncias obtidos são muito pequenos. Isso fica claro quando são comparados genótipos do subgrupo *japonica* vs. subgrupo *indica*, onde é previamente conhecida a distância genética entre estes dois grupos. Sendo assim um sistema que indicam diferenças para apenas 1/5 dos locos acessados é parcialmente eficiente.

Finalmente, para que este sistema de marcadores seja mais eficiente em mostrar diferenças entre acessos é necessária a inclusão de novos *primers* para amplificar locos mais polimórficos entre os grupos *japonica*, *indica* e *javanica*, isto é, locos TEs mais recentes e que tenham sofrido movimentação e/ou inserção após a separação dos três subgrupos.

Conclusões

A técnica de marcadores moleculares REMAP foi eficiente na identificação da variabilidade genética entre os genótipos de arroz utilizados no trabalho.

Referências

- AGRAWAL, G.K.; YAMAZAKI, M.; KOBAYASHI, M.; HIROCHIKA, R.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon *Tos17* insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *ostac* gene. **Plant Physiology**, v.125, p.1248-1257, 2001.
- BAUMEL, A.; AINOUCHE, M.L.; KALENDAR, R.; SCHULMAN, A.H. Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (Poaceae). **Molecular Biology and Evolution**, v.19, p.1218–1227, 2002

BOYKO E.; KALENDAR R.; KORZUN V.; KOROL A.; SCHULMAN A.H.; GILLS B.S. A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defence related genes: insight into cereal chromosome structure and function. **Plant Molecular Biology**, v.48, p. 767–790, 2002.

BRETÓ, M. P.; RUIZ, C.; PINA, J. A.; ASINS, M. J.; The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.21, p.285-293, 2001.

CAO, D. et al. Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. rice cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 5, p. 1630-1635, 1997.

CASTELO BRANCO, J. S.; VIEIRA, E.A.; MALONE, G.; MAURICIO, M.K.; MALONE, E.; BERNARDES, A.; MISTURA, C.C.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. **Journal of Applied Genetics**, v.48, n.2, p.107–113, 2007.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology**, v.19, p.1-8, 2001.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, v.2, 2003. 585 p.

DAVIERWALA, A. P. et al. Use of three different marker systems to estimate genetic diversity of Indian elite rice varieties. **Genetica**, Dordrecht, v. 108, p. 269-284, 2000.

DE KONING, A.P.J; GU, W.; CASTOE, T.A.; BATZER, M.A.; POLLOCK, D.D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. **PLOS Genetics**, v.7, 2011.

FLAVELL, R.B. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. Philosophical Transactions of the Royal Society. **Biological Sciences**, v.312, p.227-242, 1986.

FLAVELL A.J.; DUNABAR, E.; ANDERSON, R.; PEARCE, S.R.; HARTLEY, R.; KUMAR, A. *Ty1-copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. **Nucleic Acids Research**, v.20, p. 3639–3644, 1992.

FUENTES, J. L. et al. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 107-115, 1999.

GHAREYAZIE, B. et al. Classification of rice germplasm. I. Analysis using AFLP and PCR-based RFLP. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 91, n. 2, p. 218-227, 1995.

GOODIER, J.L.; KAZAZIAN, H.H. JR. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. **Cell**, v.135, p.23-35. 2008.

GUO, D.; ZHANG, H.; LUO, Z. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. **Plant Science**, v.170, p.528–533, 2006.

HIROCHIKA, H.K.; SUGIMOTO, Y.; OTSUKI, H.; TSUGAWA, A.; KANDA, M. Retrotransposon of rice involved in mutation by culture. **Proceedings of the National Academy Sciences**, USA, v.93, p. 7783-7788, 1996.

JANICKI, M.; ROOKE, R.; YANG, G. Bioinformatics and genomic analysis of transposable elements in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 19, n.6, p. 787-808, 2011.

KALENDER, R.; GROB, T.; REGINA, M.; SUONIEMI, A.; SCHULMAN, H. IRAP and REMAP: two new retrotransposon based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 704 – 711, 1999.

KALENDER, R.; VICIENT, C.M.; PELEG, O.; ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; BOLSHOY, A.; SCHULMAN, H. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. **Genetics**, v.166, p.1437–1450, 2004.

KALENDER, R.; SCHULMAN, A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. **Nature Protocols**, v.1, p. 2478–2484, 2004.

KUMAR, A.; PEARCE, S.R.; MCLEAN K.; HARRISON, G.; HESLOP-HARRISON, J.S.; WAUGH, R.; FLAVELL, A.J. The *Ty1-copia* group of retrotransposon in plants: genomic organization, evolution, and use as molecular markers. **Genetics**, v.100, p.205 – 217, 1997.

KUMAR, A.; BENNETZEN, J.L. Plant retrotransposons. **Annual Review of Genetics**, v.33 p. 479-532, 1999.

KUMAR, A.; HIROCHIKA, H. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. **Trends Plant Science**, v.6, p. 127-134, 2001.

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; et al. (256 co-authors). Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, p.860-921. 2001.

LOPES, M. C. B. **Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de arroz irrigado**. 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MACKILL, D. J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 3, p. 889-894, 1995.

MACKILL, D. J. et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 5, p. 969-977, 1996.

MANNINEN, O.; KALENDAR, R.; ROBINSON, J.; SCHULMAN, A.H. Application of *BARE-1* retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. **Molecular Genetics and Genomics**, v.264, p. 325–334, 2000.

MANTEL, N.A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220. 1967.

MEYER, A.S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 118f. Piraciaba, Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo.

NATALI, L.; GIORDANI, T.; BUTI, M.; CAVALLINI, A. Isolation of *Ty1*-copia putative LTR. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.19, n. 3, p. 255-265, 2007.

NELLÅKER, C.; Keane, T. M.; YALCIN, B.; WONG, K.; AGAM, A.; BELGARD, G.; FLINT, J.; ADAMS, D.J.; FRANKEL, W.N.; PONTING, C.P. The genomic landscape shaped by selection on transposable elements across 18 mouse strains. **Genome Biology**, v.13, n.R45. 2012. <http://genomebiology.com/2012/13/6/R45> v.13.

PRICE, Z.; SCHULMAN, A.H.; MAYES, S. Development of new marker methods – an example from oil palm. **Plant Genetics Research**, v.1, p. 103–113, 2003.

QIAN, W. et al. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 102, n. 2-3, p. 440-449, 2001.

RANGNER, L.P. Transposons. In ZAHA A. (ed.) **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre, Editora Mercado Aberto, 1996. 159p.

ROHLF, F.J. Classification of *Aedes* by numerical taxonomic methods (Diptera, Culicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.56, p. 798-804. 1963.

ROHLF, F.J NTSYS-pc, **Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1**. Exeter Publications, New York, USA. 2000.

SAEIDI, H.; RAHIMNEJAD, M.R.; HESLOP-HARRISON, J.S. Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid D-genome *Aegilops tauschii* (*Triticeae*, *Poaceae*) sub-taxa in Iran. **Annals of Botany**, v.101, p.855-861, 2008.

SAGHAI-MARROF, M.A. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. **Proceedings of the national academy of sciences of the USA**, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.

SMITH, J.S.C.; SMITTH, O.S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, v.47, p.85-140, 1992.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numeric Taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman. 1973. 573p.

SAN MIGUEL, P.; BENNETZEN, J. L. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. **Annals of Botany**, v.82 (Supplement A), p.37-44. 1998.

SAN MIGUEL, P.; TIKHANOV, A.; JIN, Y.K.; MOTCHOULSKAIA, N.; ZAKHAROV, D.; MELAKE-BERHAN, A.; SPRINGER, P.S.; EDWARDS, K.J.; LEE, M.; AVRAMOVA, Z.; BENNETZEN, J.L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, v.274, p. 765-768, 1996.

SMYKAL P. Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for a rapid pea variety identification. **Journal of Applied Genetics**, v.47, p.221-230, 2006.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. "A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships". **The University of Kansas Scientific Bulletin**. v.38, p. 1409-1438. 1958.

SUN, C. Q. et al. Comparison of the genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 102, n. 1, p. 157-162, 2001.

TEO, C.H.; TAN, S.H.; HO, C.L.; FARIDAH, Q.Z.; OTHMAN, Y.R.; HARRISON, J.S. Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana. **Journal of Plant Biology**, v.48, p. 96–105, 2005.

TOQUICA, S.P.; RODRÍGUEZ, F.; MARTINEZ, E.; DUQUE, M.C.; TOHME, J. Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germplasm from the Amazon department in Colombia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, n.6, p.639-647, 2003.

VICIENT, C.M.; KALENDAR, R.; SCHULMAN, A.H. Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. **Genome Research**, v.11, p. 2041–2049, 2001.

VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; KOOP, M.M.; ZIMMER, P.D.; BENIN, G.; SILVA, J.A.G.; HARTWIG, I.; MALONE, G.; OLIVEIRA, A.C. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.2, 392-399, 2007.

VIRK, P. S. et al. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. **Euphytica**, Dordrecht, v. 112, n. 3, p. 275-284, 2000.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J.L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.;

SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A.H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetic**, v.8, p.973-982. 2007.

YAP, I.V.; NELSON, R.J. **WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms**. Discussion paper series no. 14. International rice Research institute, manila, Philippines. 1996.

ZHANG, Q. et al. Molecular marker heterozigosity and hybrid performance in *indica* and japonica rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 93, n. 8, p. 1218-1224, 1996.

ZHU, J. et al. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, n. 5, p. 602-611, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Lista com o número do loco de acesso no RAP-DB das enzimas envolvidas na síntese do amido.

Enzima	Nome do gene	Cromossomo	Nº Acesso RAP-DB*
ADP-Glicose Pirofosforilase (subunidade grande)	<i>OsAGPL1</i>	3	<i>Os03g0735000</i>
	<i>OsAGPL2</i>	1	<i>Os01g0633100</i>
	<i>OsAGPL3</i>	5	<i>Os05g0580000</i>
	<i>OsAGPL4</i>	7	<i>Os07g0243200</i>
	<i>OsAGPS1</i>	9	<i>Os09g0298200</i>
ADP-Glicose Pirofosforilase (subunidade pequena)	<i>OsAGPS2 (a e b)</i>	8	<i>Os08g0345800</i>
Amido Sintase (solúvel)	<i>OsSSI</i>	6	<i>Os06g0160700</i>
	<i>OsSSIIa</i>	6	<i>Os06g0229800</i>
	<i>OsSSIIb</i>	2	<i>Os02g0744700</i>
	<i>OsSSIIc</i>	10	<i>Os10g0437600</i>
	<i>OsSSIIIa</i>	8	<i>Os08g0191433</i>
	<i>OsSSIIIb</i>	4	<i>Os04g0624600</i>
	<i>OsSSIVa</i>	1	<i>Os01g0720600</i>
	<i>OsSSIVb</i>	5	<i>Os05g0533600</i>
Amido Sintase (ligado ao grânulo)	<i>OsGBSSI</i>	6	<i>Os06g0133000</i>
	<i>OsGBSSII</i>	7	<i>Os07g0412100</i>
Enzimas de Ramificação	<i>OsBEI</i>	6	<i>Os06g0726400</i>
	<i>OsBEIIa</i>	4	<i>Os04g0409200</i>
	<i>OsBEIIb</i>	2	<i>Os02g0528200</i>
Enzima de Desramificação (Isoamilase)	<i>OsISA1</i>	8	<i>Os08g0520900</i>
	<i>OsISA2</i>	5	<i>Os05g0393700</i>
	<i>OsISA3</i>	9	<i>Os09g0469400</i>
Enzima de Desramificação (Pullulanase)	<i>OsPUL</i>	4	<i>Os04g0164900</i>

*RAP-DB (banco de dados de anotação de genes do arroz)

APÊNDICE B - Combinações de *primers* utilizados no estudo das técnicas IRAP e REMAP.

COMBINAÇÕES					
IRAP					
1	LTR1 + LTR2	7	PING1F + PING1R		
2	LTR1 + LTR3	8	PONG1F + PONG1R		
3	LTR1 + LTR4	9	PING2F + PING2R		
4	LTR2 + LTR3	10	PONG2F + PONG2R		
5	LTR2 + LTR4	11	TOS17F + TOS17R		
6	LTR3 + LTR4				
REMAP					
12	TOS17F + SSR (TA) ₂₅ A	124	PONG2F + SSR (TA) ₂₅ A	232	PONG2R + SSR (TA) ₂₅ A
13	TOS17F + SSR (TA) ₂₅ T	125	PONG2F + SSR (TA) ₂₅ T	233	PONG2R + SSR (TA) ₂₅ T
14	TOS17F + SSR (TA) ₂₅ C	126	PONG2F + SSR (TA) ₂₅ C	234	PONG2R + SSR (TA) ₂₅ C
15	TOS17F + SSR (TA) ₂₅ G	127	PONG2F + SSR (TA) ₂₅ G	235	PONG2R + SSR (TA) ₂₅ G
16	TOS17R + SSR (TA) ₂₅ A	128	PING1F + SSR (TA) ₂₅ A	236	PING1R + SSR (TA) ₂₅ A
17	TOS17R + SSR (TA) ₂₅ T	129	PING1F + SSR (TA) ₂₅ T	237	PING1R + SSR (TA) ₂₅ T
18	TOS17R + SSR (TA) ₂₅ C	130	PING1F + SSR (TA) ₂₅ C	238	PING1R + SSR (TA) ₂₅ C
19	TOS17R + SSR (TA) ₂₅ G	131	PING1F + SSR (TA) ₂₅ G	239	PING1R + SSR (TA) ₂₅ G
20	TOS17F + SSR (CT) ₂₃ A	132	PONG1F + SSR (TA) ₂₅ A	240	PONG1R + SSR (TA) ₂₅ A
21	TOS17F + SSR (CT) ₂₃ T	133	PONG1F + SSR (TA) ₂₅ T	241	PONG1R + SSR (TA) ₂₅ T
22	TOS17F + SSR (CT) ₂₃ C	134	PONG1F + SSR (TA) ₂₅ C	242	PONG1R + SSR (TA) ₂₅ C
23	TOS17R + SSR (CT) ₂₃ G	135	PONG1F + SSR (TA) ₂₅ G	243	PONG1R + SSR (TA) ₂₅ G
24	TOS17R + SSR (CT) ₂₃ A	136	PING2F + SSR (TA) ₂₅ A	244	PING2R + SSR (TA) ₂₅ A
25	TOS17R + SSR (CT) ₂₃ T	137	PING2F + SSR (TA) ₂₅ T	245	PING2R + SSR (TA) ₂₅ T
26	TOS17R + SSR (CT) ₂₃ C	138	PING2F + SSR (TA) ₂₅ C	246	PING2R + SSR (TA) ₂₅ C
27	TOS17R + SSR (CT) ₂₃ G	139	PING2F + SSR (TA) ₂₅ G	247	PING2R + SSR (TA) ₂₅ G
28	TOS17F + SSR (CGC) ₁₆ A	140	PING1F + SSR (CGG) ₁₆ A	248	PING1R + SSR (CGG) ₁₆ A
29	TOS17F + SSR (CGC) ₁₆ T	141	PING1F + SSR (CGG) ₁₆ T	249	PING1R + SSR (CGG) ₁₆ T
30	TOS17F + SSR (CGC) ₁₆ C	142	PING1F + SSR (CGG) ₁₆ C	250	PING1R + SSR (CGG) ₁₆ C
31	TOS17F + SSR (CGC) ₁₆ G	143	PING1F + SSR (CGG) ₁₆ G	251	PING1R + SSR (CGG) ₁₆ G
32	TOS17R + SSR (CGC) ₁₆ A	144	PING2F + SSR (CGG) ₁₆ A	252	PING2R + SSR (CGG) ₁₆ A
33	TOS17R + SSR (CGC) ₁₆ T	145	PING2F + SSR (CGG) ₁₆ T	253	PING2R + SSR (CGG) ₁₆ T
34	TOS17R + SSR (CGC) ₁₆ C	146	PING2F + SSR (CGG) ₁₆ C	254	PING2R + SSR (CGG) ₁₆ C
35	TOS17R + SSR (CGC) ₁₆ G	147	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ G	255	PING2R + SSR (CGG) ₁₆ G
36	TOS17F + SSR (GA) ₂₃ A	148	PING1F + SSR (GCG) ₁₆ A	256	PING1R + SSR (GCG) ₁₆ A
37	TOS17F + SSR (GA) ₂₃ T	149	PING1F + SSR (GCG) ₁₆ T	257	PING1R + SSR (GCG) ₁₆ T
38	TOS17F + SSR (GA) ₂₃ C	150	PING1F + SSR (GCG) ₁₆ C	258	PING1R + SSR (GCG) ₁₆ C

39	TOS17F + SSR (GA) ₂₃ G	151	PING1F + SSR (GCG) ₁₆ G	259	PING1R + SSR (GCG) ₁₆ G
40	TOS17R + SSR (GA) ₂₃ A	152	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ A	260	PING2R + SSR (GCG) ₁₆ A
41	TOS17R + SSR (GA) ₂₃ T	153	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ T	261	PING2R + SSR (GCG) ₁₆ T
42	TOS17R + SSR (GA) ₂₃ C	154	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ C	262	PING2R + SSR (GCG) ₁₆ C
43	TOS17R + SSR (GA) ₂₅ G	155	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ G	263	PING2R + SSR (GCG) ₁₆ G
44	TOS17F + SSR (CCG) ₁₆ A	156	PING1F + SSR (CT) ₂₃ A	264	PING1R + SSR (CT) ₂₃ A
45	TOS17F + SSR (CCG) ₁₆ T	157	PING1F + SSR (CT) ₂₃ T	265	PING1R + SSR (CT) ₂₃ T
46	TOS17F + SSR (CCG) ₁₆ C	158	PING1F + SSR (CT) ₂₃ C	266	PING1R + SSR (CT) ₂₃ C
47	TOS17F + SSR (CCG) ₁₆ G	159	PING1F + SSR (CT) ₂₃ G	267	PING1R + SSR (CT) ₂₃ G
48	TOS17R + SSR (CCG) ₁₆ A	160	PING2F + SSR (CT) ₂₃ A	268	PING2R + SSR (CT) ₂₃ A
49	TOS17R + SSR (CCG) ₁₆ T	161	PING2F + SSR (CT) ₂₃ T	269	PING2R + SSR (CT) ₂₃ T
50	TOS17R + SSR (CCG) ₁₆ C	162	PING2F + SSR (CT) ₂₃ C	270	PING2R + SSR (CT) ₂₃ C
51	TOS17R + SSR (CCG) ₁₆ G	163	PING2F + SSR (CT) ₂₃ G	271	PING2R + SSR (CT) ₂₃ G
52	TOS17F + SSR (CGG) ₁₆ A	164	PONG1F + SSR (CT) ₂₃ A	272	PONG1R + SSR (CT) ₂₃ A
53	TOS17F + SSR (CGG) ₁₆ T	165	PONG1F + SSR (CT) ₂₃ T	273	PONG1R + SSR (CT) ₂₃ T
54	TOS17F + SSR (CGG) ₁₆ C	166	PONG1F + SSR (CT) ₂₃ C	274	PONG1R + SSR (CT) ₂₃ C
55	TOS17F + SSR (CGG) ₁₆ G	167	PONG1F + SSR (CT) ₂₃ G	275	PONG1R + SSR (CT) ₂₃ G
56	TOS17R + SSR (CGG) ₁₆ A	168	PONG2F + SSR (CT) ₂₃ A	276	PONG2R + SSR (CT) ₂₃ A
57	TOS17R + SSR (CGG) ₁₆ T	169	PONG2F + SSR (CT) ₂₃ T	277	PONG2R + SSR (CT) ₂₃ T
58	TOS17R + SSR (CGG) ₁₆ C	170	PONG2F + SSR (CT) ₂₃ C	278	PONG2R + SSR (CT) ₂₃ C
59	TOS17R + SSR (CGG) ₁₆ G	171	PONG2F + SSR (CT) ₂₃ G	279	PONG2R + SSR (CT) ₁₂₃ G
60	TOS17F + SSR (GCG) ₁₆ A	172	PING1F + SSR (CGC) ₁₆ A	280	PING1R + SSR (CGC) ₁₆ A
61	TOS17F + SSR (GCG) ₁₆ T	173	PING1F + SSR (CGC) ₁₆ T	281	PING1R + SSR (CGC) ₁₆ T
62	TOS17F + SSR (GCG) ₁₆ C	174	PING1F + SSR (CGC) ₁₆ C	282	PING1R + SSR (CGC) ₁₆ C
63	TOS17F + SSR (GCG) ₁₆ G	175	PING1F + SSR (CGC) ₁₆ G	283	PING1R + SSR (CGC) ₁₆ G
64	TOS17R + SSR (GCG) ₁₆ A	176	PING2F + SSR (CGC) ₁₆ A	284	PING2R + SSR (CGC) ₁₆ A
65	TOS17R + SSR (GCG) ₁₆ T	177	PING2F + SSR (CGC) ₁₆ T	285	PING2R + SSR (CGC) ₁₆ T
66	TOS17R + SSR (GCG) ₁₆ C	178	PING2F + SSR (CGC) ₁₆ C	286	PING2R + SSR (CGC) ₁₆ C
67	TOS17R + SSR (GCG) ₁₆ G	179	PING2F + SSR (CGC) ₁₆ G	287	PING2R + SSR (CGC) ₁₆ G
68	LTR1 + SSR (TA) ₂₅ A	180	PONG1F + SSR (CGC) ₁₆ A	288	PONG1R + SSR (CGC) ₁₆ A
69	LTR1 + SSR (TA) ₂₅ T	181	PONG1F + SSR (CGC) ₁₆ T	289	PONG1R + SSR (CGC) ₁₆ T
70	LTR1 + SSR (TA) ₂₅ C	182	PONG1F + SSR (CGC) ₁₆ C	290	PONG1R + SSR (CGC) ₁₆ C
71	LTR1 + SSR (TA) ₂₅ G	183	PONG1F + SSR (CGC) ₁₆ G	291	PONG1R + SSR (CGC) ₁₆ G
72	LTR2 + SSR (TA) ₂₅ A	184	PONG2F + SSR (CGC) ₁₆ A	292	PONG2R + SSR (CGC) ₁₆ A
73	LTR2 + SSR (TA) ₂₅ T	185	PONG2F + SSR (CGC) ₁₆ T	293	PONG2R + SSR (CGC) ₁₆ T
74	LTR2 + SSR (TA) ₂₅ C	186	PONG2F + SSR (CGC) ₁₆ C	294	PONG2R + SSR (CGC) ₁₆ C
75	LTR2 + SSR (TA) ₂₅ G	187	PONG2F + SSR (CGC) ₁₆ G	295	PONG2R + SSR (CGC) ₁₆ G

76	LTR3 + SSR (TA) ₂₅ A	188	PING1F + SSR (CGG) ₁₆ A	296	PING1R + SSR (CGG) ₁₆ A
77	LTR3 + SSR (TA) ₂₅ T	189	PING1F + SSR (CGG) ₁₆ T	297	PING1R + SSR (CGG) ₁₆ T
78	LTR3 + SSR (TA) ₂₅ C	190	PING1F + SSR (CGG) ₁₆ C	298	PING1R + SSR (CGG) ₁₆ C
79	LTR3 + SSR (TA) ₂₅ G	191	PING1F + SSR (CGG) ₁₆ G	299	PING1R + SSR (CGG) ₁₆ G
80	LTR4 + SSR (TA) ₂₅ A	192	PING2F + SSR (CGG) ₁₆ A	300	PING2R + SSR (CGG) ₁₆ A
81	LTR4 + SSR (TA) ₂₅ T	193	PING2F + SSR (CGG) ₁₆ T	301	PING2R + SSR (CGG) ₁₆ T
82	LTR4 + SSR (TA) ₂₅ C	194	PING2F + SSR (CGG) ₁₆ C	302	PING2R + SSR (CGG) ₁₆ C
83	LTR4 + SSR (TA) ₂₅ G	195	PING2F + SSR (CGG) ₁₆ G	303	PING2R + SSR (CGG) ₁₆ G
84	PONG1F + SSR (CCG) ₁₆ A	196	PONG1F + SSR (CGG) ₁₆ A	304	PONG1R + SSR (CGG) ₁₆ A
85	PONG1F + SSR (CCG) ₁₆ T	197	PONG1F + SSR (CGG) ₁₆ T	305	PONG1R + SSR (CGG) ₁₆ T
86	PONG1F + SSR (CCG) ₁₆ C	198	PONG1F + SSR (CGG) ₁₆ C	306	PONG1R + SSR (CGG) ₁₆ C
87	PONG1F + SSR (CCG) ₁₆ G	199	PONG1F + SSR (CGG) ₁₆ G	307	PONG1R + SSR (CGG) ₁₆ G
88	PONG2F + SSR (CCG) ₁₆ A	200	PONG2F + SSR (CGG) ₁₆ A	308	PONG2R + SSR (CGG) ₁₆ A
89	PONG2F + SSR (CCG) ₁₆ T	201	PONG2F + SSR (CGG) ₁₆ T	309	PONG2R + SSR (CGG) ₁₆ T
90	PONG2F + SSR (CCG) ₁₆ C	202	PONG2F + SSR (CGG) ₁₆ C	310	PONG2R + SSR (CGG) ₁₆ C
91	PONG2F + SSR (CCG) ₁₆ G	203	PONG2F + SSR (CGG) ₁₆ G	311	PONG2R + SSR (CGG) ₁₆ G
92	PING1F + SSR (GA) ₂₃ A	204	PING1F + SSR (GCG) ₁₆ A	312	PING1R + SSR (GCG) ₁₆ A
93	PING1F + SSR (GA) ₂₃ T	205	PING1F + SSR (GCG) ₁₆ T	313	PING1R + SSR (GCG) ₁₆ T
94	PING1F + SSR (GA) ₂₃ C	206	PING1F + SSR (GCG) ₁₆ C	314	PING1R + SSR (GCG) ₁₆ C
95	PING1F + SSR (GA) ₂₃ G	207	PING1F + SSR (GCG) ₁₆ G	315	PING1R + SSR (GCG) ₁₆ G
96	PING2F + SSR (GA) ₂₃ A	208	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ A	316	PING2R + SSR (GCG) ₁₆ A
97	PING2F + SSR (GA) ₂₃ T	209	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ T	317	PING2R + SSR (GCG) ₁₆ T
98	PING2F + SSR (GA) ₂₃ C	210	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ C	318	PING2R + SSR (GCG) ₁₆ C
99	PING2F + SSR (GA) ₂₃ G	211	PING2F + SSR (GCG) ₁₆ G	319	PING2R + SSR (GCG) ₁₆ G
100	PONG1F + SSR (GA) ₂₃ A	212	PONG1F + SSR (CCG) ₁₆ A	320	PONG1R + SSR (CCG) ₁₆ A
101	PONG1F + SSR (GA) ₂₃ T	213	PONG1F + SSR (CCG) ₁₆ T	321	PONG1R + SSR (CCG) ₁₆ T
102	PONG1F + SSR (GA) ₂₃ C	214	PONG1F + SSR (CCG) ₁₆ C	322	PONG1R + SSR (CCG) ₁₆ C
103	PONG1F + SSR (GA) ₂₃ G	215	PONG1F + SSR (CCG) ₁₆ G	323	PONG1R + SSR (CCG) ₁₆ G
104	PONG2F + SSR (GA) ₂₃ A	216	PONG2F + SSR (CCG) ₁₆ A	324	PONG2R + SSR (CCG) ₁₆ A
105	PONG2F + SSR (GA) ₂₃ T	217	PONG2F + SSR (CCG) ₁₆ T	325	PONG2R + SSR (CCG) ₁₆ T
106	PONG2F + SSR (GA) ₂₃ C	218	PONG2F + SSR (CCG) ₁₆ C	326	PONG2R + SSR (CCG) ₁₆ C
107	PONG2F + SSR (GA) ₂₃ G	219	PONG2F + SSR (CCG) ₁₆ G	327	PONG2R + SSR (CCG) ₁₆ G
108	PONG1R + SSR (CCG) ₁₆ A	220	PING1F + SSR (CCG) ₁₆ A	328	PING1R + SSR (CCG) ₁₆ A
109	PONG1R + SSR (CCG) ₁₆ T	221	PING1F + SSR (CCG) ₁₆ T	329	PING1R + SSR (CCG) ₁₆ T
110	PONG1R + SSR (CCG) ₁₆ C	222	PING1F + SSR (CCG) ₁₆ C	330	PING1R + SSR (CCG) ₁₆ C
111	PONG1R + SSR (CCG) ₁₆ G	223	PING1F + SSR (CCG) ₁₆ G	331	PING1R + SSR (CCG) ₁₆ G
112	PONG2R + SSR (CCG) ₁₆ A	224	PING2F + SSR (CCG) ₁₆ A	332	PING2R + SSR (CCG) ₁₆ A

113	PONG2R + SSR (CCG) ₁₆ T	225	PING2F + SSR (CCG) ₁₆ T	333	PING2R + SSR (CCG) ₁₆ T
114	PONG2R + SSR (CCG) ₁₆ C	226	PING2F + SSR (CCG) ₁₆ C	334	PING2R + SSR (CCG) ₁₆ C
115	PONG2R + SSR (CCG) ₁₆ G	227	PING2F + SSR (CCG) ₁₆ G	335	PING2R + SSR (CCG) ₁₆ G
116	PING1R + SSR (GA) ₂₃ A	228	PONG1R + SSR (GA) ₂₃ A	336	PONG2R + SSR (GA) ₂₃ A
117	PING1R + SSR (GA) ₂₃ T	229	PONG1R + SSR (GA) ₂₃ T	337	PONG2R + SSR (GA) ₂₃ T
118	PING1R + SSR (GA) ₂₃ C	230	PONG1R + SSR (GA) ₂₃ C	338	PONG2R + SSR (GA) ₂₃ C
119	PING1R + SSR (GA) ₂₃ G	231	PONG1R + SSR (GA) ₂₃ G	339	PONG2R + SSR (GA) ₁₂₃ G
120	PING2R + SSR (GA) ₂₃ A				
121	PING2R + SSR (GA) ₂₃ T				
122	PING2R + SSR (GA) ₂₃ C				
123	PING2R + SSR (GA) ₂₃ G				

Vitae

Naciele Marini nasceu em 22 de agosto de 1982, em Pelotas-RS, filha de Germano Luiz Marini e Vanda Maria Marini, natural de Pelotas – RS. Completou o Ensino Fundamental (1º grau) na escola Imaculada Conceição, em Pelotas (RS) e Ensino Médio (2º grau) no Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG), em Pelotas (RS). Em março de 2000 ingressou, no curso de Ciências-Química na Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), obtendo o título de Química no ano de 2004. Em fevereiro de 2006 iniciou sua trajetória no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) na FAEM/UFPEL, inicialmente como estagiária voluntária e cursando disciplinas como aluna especial, atuando em projetos e participando no desenvolvimento de trabalhos relacionados ao melhoramento genético das culturas de aveia branca, arroz e trigo, onde participou de vários congressos. A partir de agosto de 2006, foi bolsista CNPq – Apoio técnico. Em agosto de 2007 ingressou no mestrado na área de concentração em Fitomelhoramento, pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA/FAEM/UFPEL), sob orientação do professor Antônio Costa de Oliveira, concluindo em Agosto de 2009 e em Março de 2010 ingressou como aluna de Doutorado pelo mesmo programa, sob orientação do professor Luciano Carlos da Maia. Durante o curso, no período de Agosto de 2010 a Fevereiro de 2012, atuou como Responsável técnica do laboratório de biologia molecular do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, também desenvolveu atividades em diversos trabalhos e em alguns projetos, inclusive participando do projeto EVOCODE, que integra a Universidade Federal de Pelotas (Brasil) e a Universidad Politécnica de Valência (Espanha), concluindo o Doutorado em Dezembro de 2012. Durante sua vida acadêmica, na qualidade de autoria ou co-autoria publicou mais de 60 resumos e 5 artigos científicos em periódicos.