

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
SEMENTES**



DISSERTAÇÃO

**Fragmentos de genes diferencialmente expressos durante a
germinação/emergência do arroz sob estresse da profundidade**

Fernanda Plucani do Amaral

Pelotas, março de 2010

Fernanda Plucani do Amaral

**Fragmentos de genes diferencialmente expressos durante a
germinação/emergência do arroz sob estresse da profundidade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Pelotas, março de 2010

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

A485f Amaral, Fernanda Plucani do

Fragmentos de genes diferencialmente expressos durante a germinação/emergência do arroz sob estresse da profundidade / Fernanda Plucani do Amaral ; orientador Paulo Dejalma Zimmer. - Pelotas, 2010.-57f. ; il..- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Oryza sativa L. 2.Germinação 3.Emergência 4.cDNA-AFLP I Zimmer, Paulo Djalma(orientador) II .Título.

CDD 633.18

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Dejalma Zimmer, Orientador

Prof. Dr. Antonio Carlos Souza Albuquerque Barros

Prof. Dr. Silmar Teichert Peske

Pesq. Dr. Geri Eduardo Meneghello

Prof^a. Dr^a. Maria Angela André Tillmann (suplente)

DEDICATÓRIA

*À minha família, meus pais Mauro e Vera,
minhas irmãs Fabiana e Flávia e minha avó Docelina,
pessoas que amo e admiro.*

*Ao meu afilhado Bernardo,
que Deus nos presenteou como
símbolo de amor e alegria.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo.

Aos meus pais, pelo amor, dedicação e apoio incessante. Pelo exemplo de luta e caráter que me ensinou a nunca desistir e buscar ser sempre uma pessoa melhor.

À minha avó Docelina e minhas irmãs Fabiana e Flávia, pelo carinho, amizade, paciência e companheirismo que foram essenciais durante estes dois anos.

Aos meus cunhados Leonardo Moglia e Henrique Dallmann, pelas conversas de incentivo, conselhos e caronas sempre fora de hora. Ao meu afilhado Bernardo que me despertou um sentimento único de amor e felicidade.

As amigas que acompanharam diariamente meus acertos e erros e que de alguma forma souberam incentivar meu desenvolvimento pessoal.

Aos amigos, colegas e exemplos de pesquisadores Liliane Mertz e Fernando Henning pela amizade e atenção. Agradeço pelos valiosos conselhos, conversas e auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pois não foram poucas as vezes que recorri aos seus conhecimentos e experiência de laboratório.

Ao professor Paulo Dejalma Zimmer, pela orientação, compreensão e ensinamentos que acentuaram meu crescimento na pesquisa.

Agradeço à equipe do Laboratório de Biossistemas, às funcionárias do LAS pela ajuda e amizade.

Ao curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, pois me permitiu ampliar a visão sobre pesquisa e desenvolvimento biotecnológico, mas acima de tudo pela oportunidade de conviver com pessoas de diversas origens, que se tornaram grandes amigas e apoiadoras no curso da vida.

Ao CNPq, pela ajuda financeira para realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	VI
Lista de Tabelas	VII
Resumo	VIII
Abstract.....	IX
1 Introdução	1
2 Revisão de Literatura.....	5
2.1 Origem e Domesticação da Cultura do Arroz.....	5
2.2 Classificação Botânica.....	6
2.3 A Cultura do Arroz	7
2.4 Estresses Abióticos.....	8
2.5 Germinação e Emergência	9
2.6 Caracterização dos Genótipos.....	10
2.6.1 BRS 7 Taim.....	10
2.6.2 Arroz Vermelho	10
2.6.3 Nipponbare	11
2.7 Melhoramento Genético.....	12
2.8 Marcadores Moleculares.....	13
2.8.1 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)	15
2.9 cDNA-AFLP	16
3 Material e Métodos.....	18
3.1 Obtenção do tecido vegetal	18
3.2 Obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos e avaliação do polimorfismo genético pela técnica de cDNA – AFLP	19
3.3 Extração do RNA total	19
3.3.1 Purificação do RNA.....	20
3.4 Obtenção do cDNA.....	21
3.4.1 Síntese da primeira fita de cDNA.....	21

3.4.2 Síntese da segunda fita de cDNA.....	21
3.5 cDNA-AFLP.....	22
3.5.1 Reação de digestão do cDNA.....	22
3.5.2 Ligação de adaptadores.....	22
3.5.3 Pré-amplificação.....	23
3.5.4 Amplificação Seletiva.....	23
3.6 Detecção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos	25
3.7 Preparo e montagem das placas.....	25
3.8 Preparo da solução do gel de poliacrilamida (5%)	26
3.9 Revelação do gel utilizando Nitrato de Prata	26
3.9.1 Preparo das soluções para revelação com nitrato de prata.....	27
3.10 Interpretação dos resultados.....	28
4 Resultados e Discussão.....	29
5 Conclusão.....	36
6 Referências Bibliográficas.....	37

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Germinação a 15cm de profundidade em bandejas plásticas com areia estéril aos quatro dias após a semeadura, sendo que cada tubo de PVC representa um genótipo 19
- FIGURA 2** **(A)** RNA total extraído utilizando reagente *Trizol*, visualizado em gel de agarose 1,5% corados com Brometo de etídio. As quatro primeiras canaletas mostram a concentração de RNA total da cultivar BRS 7 Taim identificada pelas épocas de semeadura 4, 7, 14 e 21 dias, seguida pelas amostras do ecótipo de arroz vermelho (FFS-45) e da variedade Nipponbare, respectivamente. **(B)** – Padrão de cDNA obtido após *bulk* de RNA total de cada época de semeadura, visualizado em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio, identificados através das letras T- BRS 7 Taim; AV – arroz vermelho; N – Nipponbare e M – marcador de peso molecular..... 29
- FIGURA 3** Fragmentos diferencialmente expressos presentes somente na cultivar BRS 7 “Taim”, separados em gel de poliacrilamida 6% corado com Nitrato de Prata, obtidos através da técnica de cDNA – AFLP utilizando a combinação de *primers* E-AGC / M-CTA. As setas indicam os fragmentos identificados 31
- FIGURA 4** Separação de fragmentos através da técnica de cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 6%, corado com Nitrato de Prata. Os fragmentos foram, utilizando as combinações de primers **(A)** E-AGG / M-CAG, **(B)** E-ACC / M-CAC. As setas vermelhas indicam os fragmentos identificados no ecótipo de arroz vermelho, e as setas pretas indicam fragmentos presentes nos três genótipos 32
- FIGURA 5** Identificação de fragmentos com expressão diferencial na intensidade de bandas, separados em gel de poliacrilamida 5%. As letras T, AV e N representam, respectivamente, as cultivares BRS 7 Taim, ecótipo de arroz vermelho FFS-45 e Nipponbare. As setas indicam a seqüência de bandas presentes nos três genótipos, sendo que a cultivar Taim apresenta-se mais intensa 35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Combinações de <i>primers</i> utilizados nas reações de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP 24
TABELA 2	Programação do termociclador utilizada para reação de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP 25

RESUMO

AMARAL, Fernanda Plucani. **Identificação de fragmentos diferencialmente expressos na germinação/emergência de arroz vermelho e cultivado, sob estresse da profundidade.** 2010, 53p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Cultivado em todo continente, o arroz (*Oryza sativa* L.) possui grande importância social e econômica, além de ser uma planta modelo para estudos de genética e fisiologia de plantas cultivadas. O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais desta cultura, sendo que o Rio Grande do Sul é responsável por 60% da produção brasileira. Devido a sua versatilidade e adaptabilidade a diferentes condições de solos e climas, cabe ao melhoramento genético a busca de mecanismos ligados a resistência das plantas a diferentes estresses bióticos e abióticos, alta produtividade e qualidade, sendo, para isto, imprescindível a presença de variabilidade genética. Neste sentido, acessos de arroz vermelho têm sido muito utilizados, pois possuem uma gama de genes ainda não identificados, e a identificação do recurso responsável pela competição e características morfológicas possíveis de serem introduzidas no arroz cultivado, torna essa espécie atrativa para identificação e caracterização de genes e envolvidos no processo de germinação / emergência, em estudos de expressão diferencial. Este estudo tem por objetivo identificar fragmentos diferencialmente expressos na germinação/emergência de um ecótipo de arroz vermelho e dois genótipos cultivados, submetidos ao estresse da profundidade (BRS 7 Taim representando o arroz cultivado, o ecótipo de arroz vermelho FFS-45 e a cultivar Nipponbare). Os genótipos foram colocados para germinar a 15cm de profundidade. Amostras foram coletadas aos 4 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a semeadura sendo que logo após cada coleta foi extraído o RNA para construção de cDNA. Para obtenção dos fragmentos de genes diferencialmente expressos entre os genótipos, utilizou-se a técnica de cDNA-AFLP, onde foram testadas 16 combinações de *primers*, que possibilitou a identificação de 95 fragmentos diferencialmente expressos, sendo que 3 destas combinações não apresentaram amplificação. A análise das bandas foi realizada através da visualização em gel de acrilamida, utilizando o critério de presença e/ou ausência de bandas entre os genótipos e diferença de intensidade entre os fragmentos. A partir da identificação desses genes, mediante estudos de sequenciamento, caracterização e clonagem, será possível contribuir para os estudos relacionados à identificação de genes envolvidos com a germinação e emergência do arroz.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., germinação/emergência, cDNA-AFLP.

ABSTRACT

AMARAL, Fernanda Plucani. **Identification of fragments differential expressed in germination / emergence of red rice and cultivated under stress of depth.** 2010, 53p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Grown on every continent, rice (*Oryza sativa* L.) has great social and economic as well as being a model plant for studies of genetics and physiology of plants. Brazil is among the top ten world producers of this culture, and the Rio Grande do Sul is responsible for 60% of Brazilian production. Due to its versatility and adaptability to different soils and climates, it is the breeding of the search mechanisms on the resistance of plants to different biotic and abiotic stresses, high productivity and quality, and for this, absolutely the presence of genetic variability. In this sense, red rice accessions have been widely used because they have a range of as yet unidentified genes, and identification of the resource responsible for competition and morphological possible be brought into cultivated rice, makes this species attractive for the identification and characterization of genes and involved in the process of germination / emergence, in studies of differential expression. This study aims to identify differentially expressed fragments in the germination / emergence of red rice ecotype and two genotypes grown under stress depth (BRS Taim 7 representing the cultivated rice, the red rice ecotype FFS-45 and cultivar Nipponbare). The lines were placed to germinate at 15cm depth. Samples were collected at 4 days, 7 days, 14 days and 21 days after sowing and soon after each collection was extracted RNA for construction of cDNA. To obtain the fragments of differentially expressed genes among genotypes, we used the technique of cDNA-AFLP, which were tested 16 primer combinations, which allowed the identification of 95 differentially expressed fragments, and 3 of these compounds showed no amplification. The analysis of the bands was performed by visualization on acrylamide gels, using the criterion of presence or absence of bands between the genotypes and the difference in intensity between fragments. By identifying these genes by sequencing study, characterization and cloning, will contribute to studies related to the identification of genes involved in germination and emergence of rice.

Keywords: *Oryza sativa* L., germination/emergence, cDNA-AFLP.

INTRODUÇÃO

Cultivado em todos os continentes, o arroz (*Oryza sativa* L.) possui grande importância social e econômica, além de apresentar uma série de características fisiológicas e genéticas que o tornam uma planta modelo para estudos de interesse a fisiologia das plantas cultivadas (BENNETZEN & FREELING, 1993; GALE & DEVOS, 1998; BENNETZEN, 2002; SGUAREZI et al., 2003; SGUAREZI et al., 2004).

Componente básico na dieta alimentar de 2/3 da população do planeta, devido ao seu alto valor nutricional, o arroz destaca-se no cenário agrícola mundial com uma produção de 590 milhões de toneladas em uma área de 150 milhões de hectares cultivada anualmente (EMBRAPA, 2009).

O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais desta cultura, com cerca de 12 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2009; FAOSTAT, 2009). Dentre os estados produtores, o Rio Grande do Sul é responsável por 60% da produção brasileira, com uma área plantada de pouco mais de 1 milhão de hectares segundo o Instituto Rio Grandense do Arroz – IRGA (2009). A crescente demanda por esta cultura, considerada a espécie de maior potencial para o combate a fome mundial, devido a sua versatilidade e adaptabilidade a diferentes condições de solos e climas, remete ao melhoramento genético na busca de mecanismos ligados a resistência das plantas a diferentes estresses bióticos e abióticos, alta produtividade e qualidade, sendo imprescindível a presença de variabilidade genética.

As espécies silvestres de arroz vêm sendo utilizadas nos programas de melhoramento genético tanto para ampliar a base genética das populações, quanto para transferir características específicas para as variedades cultivadas. Acessos de

arroz vermelho têm sido muito utilizados com este enfoque, pois possuem uma gama de genes ainda não identificados que podem conferir vantagens para as variedades de arroz cultivado. Por pertencerem à mesma espécie botânica as condições climáticas ideais para o desenvolvimento do arroz cultivado, favorece também o crescimento do arroz vermelho tornando - o um competidor em potencial da cultura. A identificação do recurso responsável pela competição e características morfológicas possíveis de serem introduzidas no arroz cultivado, através do melhoramento genético, torna o arroz vermelho atrativo para identificação de genes e mapeamento de caracteres de interesse envolvidos no processo de germinação / emergência, em estudos de expressão diferencial (MALONE et al, 2006).

Os estresses ambientais a que as plantas são submetidas diariamente, como excesso ou falta de água, salinidade e temperatura, afetam diretamente no desempenho e no desenvolvimento destas. Um tipo de estresse abiótico que tem sido estudado é a profundidade de semeadura, que afeta principalmente a uniformidade do estande das lavouras. Estudos mostram que esta característica pode ser positiva para algumas espécies, mas principalmente para o desenvolvimento de bancos de sementes de daninhas no solo. O arroz vermelho possui maior longevidade quando as sementes são depositadas em profundidade no solo que na superfície (NOLDIN, 1995), e seu desenvolvimento de parte aérea é superior ao cultivado quando submetido a este estresse.

O melhoramento genético vem evoluindo em diferentes áreas, permitindo aos melhoristas aumentarem a eficiência na seleção e explorar mais racionalmente os recursos genéticos. Sua contribuição no plano mundial é inegável, respondendo por 50% dos aumentos em produtividade nas espécies cultivadas, assim como para redução dos custos de produção e para incorporação de novas áreas de produção (RAMALHO, 2004; NETO et al., 2008). Em 2004, foi anunciado o seqüenciamento completo do genoma do arroz. Como consequência desse estudo, que reuniu pesquisadores de dez países, existe atualmente uma grande expectativa na identificação de genes que sejam importantes para o melhoramento genético e que contribuam para o aumento da produtividade dessa cultura. Além disso, o arroz apresenta sintonia com outros cereais, ou seja, possui blocos de genes conservados, tanto em relação à localização e ordem, quanto à similaridade em conteúdo e seqüência.

Ferreira (2003) ressalta a importância do conhecimento da sequência completa do genoma estrutural do arroz, já que é de grande interesse para a pesquisa básica e aplicada na área agrícola. E destaca o potencial genômico presente em cultivares de arroz da subespécie *indica* devido à sintonia que possui com outras gramíneas, como é o caso da cultivar Taim, que é descendente da seleção de plantas híbridas (cruzamento desconhecido), encontrada na área experimental de melhoramento de arroz da Embrapa.

O desenvolvimento de pesquisas com enfoque genético-molecular utilizando genótipos de arroz com contraste fenotípico para o caráter germinação / emergência, através do isolamento de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos – cDNA/AFLP (MAO et al., 2004), permite o isolamento de fragmentos dos genes relacionados aos contrastes existentes entre os genótipos e entre as fases de desenvolvimento (germinação e emergência). A técnica de marcadores moleculares baseada no polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) tem sido bastante utilizada, principalmente devido à sua capacidade em acessar a variabilidade a nível de genoma, detectando um grande número de fragmentos por reação possibilitando uma amostragem ampla e simultânea, o que torna a técnica mais específica e de considerável repetibilidade (SPOONER et al, 2005). Contudo, o conhecimento do genoma do arroz pode ser aplicado a outras culturas de interesse agrônomo como milho e trigo, oferecendo a base para a interpretação da informação genética e molecular, disponibilizando informações e alternativas biotecnológicas para auxiliar na seleção e transferência de genes. Isso possibilita a identificação de enzimas envolvidas nas rotas metabólicas que participam do processo de germinação / emergência do arroz, sendo que estas informações podem ser futuramente, utilizadas nos programas de melhoramento genético do arroz e de outros cereais para o desenvolvimento de genótipos com desempenho superior para o caráter estudado, através da seleção assistida.

A capacidade de competição na germinação e emergência de arroz vermelho e arroz cultivado quando se trata de profundidade, é um tema muito estudado (MARCHEZAN et al., 2003; LACERDA, 2007), pois é conhecido que o arroz vermelho possui uma alta capacidade de desenvolvimento em relação ao cultivado. Baseados nestas informações, a aplicação da técnica de cDNA pode proporcionar o

isolamento de fragmentos de genes relacionados com esta capacidade competitiva diferencial durante a germinação e emergência do arroz.

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

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem e domesticação da cultura do Arroz

O sudeste da Ásia é considerado o centro de origem do arroz (HARLAND, 1975; CHANG, 1976; MATSUO et al., 1997) juntamente com a Índia que apresenta numerosas variedades endêmicas. As mais antigas referências ao arroz são encontradas na literatura chinesa, há cerca de 5.000 anos. O arroz é cultivado em países de climas tropicais e subtropicais. Certas diferenças entre as formas de arroz cultivadas na Índia e sua classificação em grupos, de acordo com ciclo, exigência hídrica e valor nutritivo, foram mencionadas cerca de 1.000 a.C. Da Índia, essa cultura provavelmente estendeu-se à China e à Pérsia, difundindo-se, mais tarde, para o sul e o leste, passando pelo Arquipélago Malaio, e alcançando a Indonésia, em torno de 1500 a.C.

A cultura é muito antiga nas Filipinas e, no Japão, foi introduzida pelos chineses cerca de 100 anos a.C. Até sua introdução pelos árabes no Delta do Nilo, o arroz não era conhecido nos países Mediterrâneos. Foram, provavelmente, os portugueses quem introduziram esse cereal na África Ocidental, e os espanhóis, os responsáveis pela sua disseminação nas Américas (EMBRAPA, 2009). Devido a esta vasta distribuição acredita-se ter existido um genitor comum nas regiões úmidas do supercontinente Gondwana antes de sua quebra e deriva (CHANG, 1976).

Foi introduzido no Brasil pela frota de Pedro Álvares Cabral, porém o cultivo do arroz para uso próprio só foi relatado após 1530 na capitania de São Vicente. Pelos tupis era conhecido como “milho d’água” (abati-uauapé), colhiam nos alagados próximos ao litoral. Em 1587, lavouras arrozeiras já ocupavam terras na Bahia e, por

volta de 1745, no Maranhão. Em 1766, foi instalada a primeira descascadora de arroz do Brasil, no Rio de Janeiro.

Quanto ao Rio Grande do Sul, atual estado maior produtor de arroz, Auguste de Saint Hilaire, em sua viagem ao Estado, realizada nos anos de 1820/21, já fala da ocorrência de lavouras desse cereal. Outros autores citam os colonos alemães de Santa Cruz do Sul e Taquara como os introdutores da cultura no Estado, sempre em pequenas lavouras, em estilo colonial. Mas foi em 1904, no município de Pelotas, que surge a primeira lavoura empresarial, já então irrigada. Depois, a cultura chegou a Cachoeira do Sul e, a partir de 1912, teve um grande impulso, graças aos locomóveis fabricados pela empresa Mernak, que eram veículos movidos a vapor, produzido pela queima da lenha. Os locomóveis acionavam bombas de irrigação, o que facilitava a inundação das lavouras de arroz (FARSUL, 2009).

O arroz é uma cultura única em alguns aspectos, originalmente não foi cultivado em submersão, mas acredita-se que devido a mutações tornou-se uma planta aquática apresentando adaptações a diferentes condições de umidade (BORÉM et al., 2005). Sua domesticação ocorreu independentemente na Ásia e na África, onde surgiram cerca de vinte espécies diferentes, mas somente duas delas possuem valor agrônomo *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*.

A espécie *Oryza sativa* é muito comum nas regiões produtoras de arroz, a maioria das variedades cultivadas pertence a esta espécie, que é caracterizada por sua plasticidade e qualidade de sabor. Originou-se no Extremo Oriente e sofreu divisões em *O. sativa* japônica (origem chinesa) e *O. sativa* indica (origem indiana).

2.2 Classificação Botânica

O arroz é uma planta autógama, monocotiledônea da família Poaceae (Gramineae). O nome *Oryza* vem de um termo grego, e foi denominado assim por Lineu. O gênero *Oryza* é o mais rico e importante da tribo *Oryzeae*, possui cerca de 24 espécies, dispersas espontaneamente nas regiões tropicais da Ásia, África e Américas encontradas desde lagos de águas profundas, até densas florestas (UNCTAD, 2009). A espécie *Oryza sativa* é considerada polifilética, resultante do cruzamento de formas espontâneas variadas. Existem duas formas silvestres que são apontadas na literatura como precursoras do arroz cultivado: a espécie *O.*

rufipogon, procedente da Ásia, originando provavelmente a *O. sativa*; e a *O. barthii*, ou *O. breviligulata*, derivada da África Ocidental, dando origem à *O. glaberrima*.

O arroz cultivado *O. sativa* é dividido em duas subespécies: *Indica* e *Japônica* que apresentam diferentes localizações. Os cultivares *indica* estão distribuídos nas zonas tropicais e subtropicais, enquanto que os da subespécie *japônica* estão mais adaptados às zonas temperadas, isso porque estes toleram mais o frio do que os *indica*. Para serem cultivados em regiões tropicais, os *japônica* se adaptam bem ao cultivo de sequeiro (OKA, 1974).

A classificação do arroz nesses dois grupos é de valiosa importância para os melhoristas, pois indica a adaptação a ambientes específicos e influencia de certa forma, as estratégias para utilização de germoplasma. Os dois grupos são diferenciados através de um conjunto de caracteres que abrangem desde aspectos morfológicos até reações a estresses abióticos como frio e seca (MORISHIMA, 1986).

2.3 A Cultura do Arroz

A China é o principal produtor mundial de arroz, com 186.730 mil toneladas, ou seja, 30,7% do total produzido, seguida pela Índia com 20,4%. A produção brasileira corresponde a apenas 2,2% da produção mundial e tem se mantido próxima a 10 milhões de toneladas, e cresceu apenas 130.503 toneladas do período 1998 a 2001, para o período 2001 a 2003 (FAOSTAT, 2009).

O Rio Grande do Sul é responsável por 60% da produção nacional, e finalizou a safra 2008/09 com produção de 8,047 milhões de toneladas de arroz em uma área cultivada de 1,105 milhão de hectares, segundo levantamento do Instituto Rio Grandense do Arroz. O resultado indicou avanço sobre as 7,535 milhões de toneladas registradas na temporada 2007/08, que teve área semeada de 1,068 milhão de hectares (IRGA, 2009).

A lavoura de arroz tem se destacado principalmente pela modernização por que passou nos últimos tempos em aspectos como a introdução de novas variedades com maior potencial produtivo, manejo, sistemas produtivos e gerenciamento, que acrescentaram rentabilidade a esta lavoura. Demonstrado no aumento da produtividade média superior a 7,28 T/ha, apresentada no Estado, na

safras 2008/09 superando a safra anterior que apresentou 6,98 T/ha, o que mostra a evolução no desenvolvimento das lavouras ao longo das safras.

Dentre os demais produtos da lavoura do Estado a lavoura arrozeira representou 15,32% do Valor Bruto da Produção Agropecuária, cerca de R\$1,31 milhão (CONAB, 2009).

2.4 Estresses abióticos

O conceito de estresse segundo Taiz et al (2006), é definido como um fator externo, que exerce uma influencia desvantajosa para a planta. A maioria dos estresses são causados por fatores ambientais ou abióticos, e são medidos em relação a sobrevivência da planta, produtividade agrícola, crescimento ou o processo primário de assimilação, que estão relacionados ao crescimento geral. Este conceito está intimamente relacionado à tolerância ao estresse, que é a aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável. Ervas daninhas, patógenos e predação por insetos são exemplos de estresses causados por fatores bióticos.

A adaptação e aclimação das plantas ao estresse ambiental resultam de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização desde o anatômico e morfológico até o celular, bioquímico e molecular. As mudanças ocorrem gradativamente, afetando os processos de divisão celular e formação de endomembranas alterando o metabolismo das plantas. Atualmente um enfoque especial tem sido dado aos estudos moleculares relacionados às respostas genômicas da planta ao estresse. Existem diversos tipos de estresses causados por mudanças ambientais como déficit hídrico, salinidade, temperatura, deficiência de oxigênio e de manejo como a profundidade de semeadura.

A profundidade de semeadura afeta o processo de germinação e emergência das plantas, principalmente em se tratando de arroz. Noldin (1995) identificou que a longevidade de sementes de arroz vermelho decresce, consideravelmente, quando as sementes são depositadas na superfície do solo.

Assim, após a colheita do arroz, em áreas infestadas com a invasora, os produtores devem evitar a adoção de práticas de manejo do solo que provoquem o enterrio das sementes, pois estas aumentam a sua longevidade quando localizadas a maiores profundidades no solo.

2.5 Germinação e emergência

Para que uma semente germine é necessário que ela esteja em equilíbrio com o meio externo, ou seja, que haja disponibilidade de água, oxigênio, temperatura adequada e luz.

A germinação, na visão dos tecnologistas de sementes, inicia-se com a embebição, seguida do desenvolvimento da estrutura embrionária e encerra com a formação de uma plântula em que sejam evidentes as suas partes constituintes (PESKE et al, 2006). Já para os fisiologistas, a germinação encerra no momento em que há protrusão da radícula (raiz primária), pois diferentemente dos tecnologistas, os fisiologistas não consideram o estabelecimento das plantas no campo.

A água é o fator determinante para o crescimento do embrião, pois induz a atividade metabólica das sementes, melhorando assim a capacidade respiratória, ativando a síntese de enzimas e hormônios, contribuindo para a translocação e assimilação de reservas, e facilitando a protrusão da raiz primária. A embebição possui um fator trifásico de hidratação, na fase I apresenta uma rápida absorção de água, independente da atividade metabólica da semente. Essa primeira fase desencadeia a reativação do metabolismo, e o crescimento do embrião é controlado por porções ativas do genoma como RNAm armazenado no final da maturação e RNAm sintetizados após o início da hidratação de sementes. Este fato pode ser comprovado pelo aparecimento de diferentes enzimas durante os diferentes estádios de desenvolvimento do embrião (MARCOS FILHO, 2005).

As reduções nos níveis de transferência de água e respiração caracterizam a fase II. Neste momento a semente faz uma pausa na absorção para síntese de novas enzimas e RNA preparando-se metabolicamente para a protrusão da raiz primária. Na fase III há a retomada do crescimento do embrião, identificado pela protrusão da raiz.

A plântula em crescimento precisa percorrer certa distância em centímetros da semente até a superfície para se converter em um organismo fotossintetizante, este processo é denominado emergência. Como o arroz possui uma emergência do tipo hipógea, o epicótilo emerge do solo e o cotilédone permanece abaixo da

superfície até sua total decomposição. Nesta fase a planta mobiliza suas reservas presentes na semente, e prepare-se para tornar-se autotrófica.

2.6 Caracterização dos Genótipos

2.6.1 BRS 7 Taim

O cultivar BRS 7 “Taim” pertence ao grupo denominado moderno. A planta apresenta altura próxima a 100 cm e alta capacidade de perfilhamento; ciclo de 125-130 dias, da emergência à maturação; grãos tipo patna de casca lisa; alto rendimento industrial; moderadamente tolerante a toxidez por ferro, apresenta maior resistência a brusone que todos os genótipos do tipo moderno, atualmente existentes, resultando em material que diversifica geneticamente a lavoura orizícola gaúcha.

Segundo dados da EMBRAPA Clima Temperado, possui bom vigor inicial nos sistemas de cultivo de semeadura direta e cultivo mínimo, porém apresenta deficiência na capacidade de germinação e emergência no solo, principalmente sob condições adversas. É um genótipo considerado muito sensível às baixas temperaturas, e devido ao seu ciclo semi-tardio não admite semeaduras tardias, principalmente em regiões sujeitas à ocorrência de baixas temperaturas durante o ciclo da cultura, principalmente na fase reprodutiva da planta (APASSUL, 2009).

2.6.2 Arroz vermelho

O arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) é uma planta daninha invasora que pertence ao mesmo gênero e espécie do arroz cultivado, sua incidência em áreas de cultivo de arroz é problemática não só no Brasil, mas em vários países como Estados Unidos, Japão, Índia, China e nas Américas Central e Sul (CRAIGMILES et al., 1978). Esta planta exerce forte competição pelos mesmos recursos disponibilizados para o arroz, possui características bioquímicas, morfológicas e fisiológicas semelhantes ao arroz cultivado, o que torna difícil seu controle em lavouras comerciais de arroz (ELEFTHEROHORINOS et al., 2002).

As perdas de produtividade em lavouras infestadas com arroz vermelho podem facilmente superar os patamares de 30%, sendo que altos níveis de infestação podem inviabilizar áreas de produção. Estudos relatam que o arroz vermelho apresenta maior resistência a estresses bióticos e abióticos que o arroz cultivado, maior adaptabilidade, porte alto, sementes com alto vigor, alta taxa de fluxo gênico com outros cultivares de arroz e ainda podem apresentar resistência a herbicidas devido ao uso contínuo (NOLDIN et al., 1999; SHIVRAIN et al., 2007; MALONE et al., 2007).

Pesquisas comprovam a elevada variabilidade genética presente em ecótipos de arroz vermelho relacionados ao caráter germinação / emergência a grandes profundidades (PESKE, et al., 1993; PESKE, et al., 1997; SGUAREZI et al., 2003, MALONE et al., 2006), pois estes carregam um acervo de genes perdidos durante o processo de seleção à que o arroz cultivado foi submetido na busca de adaptabilidade e produtividade.

Estes estudos demonstram que a identificação destes recursos responsáveis pela maior adaptabilidade e competição que o arroz vermelho apresenta, possuem fundamental importância para o melhoramento genético na busca de características possíveis de serem introduzidas no arroz cultivado (MALONE et al, 2006).

2.6.3 Nipponbare

O cultivar Nipponbare pertence à espécie *Oryza sativa* ssp. Adaptado principalmente às regiões temperadas e, cultivado em áreas limitadas como Japão, Coreia, Taiwan e algumas partes da Europa.

A variedade de arroz que pertence a subespécie japônica foi escolhida como modelo para a codificação completa do genoma deste cereal, isso ocorreu devido a sua utilização como uma das cultivares-mãe da população F2 usada para a análise e construção do mapa genético do arroz (HARUSHIMA et al. 1998), e por apresentar um genoma relativamente pequeno com 389 Mb. Além de apresentar alto nível de regeneração através de calos, uma vantagem importante para a transformação genética, o cultivar também foi utilizado como um recurso para a construção de bibliotecas de cDNA, a fim de gerar um catálogo de ESTs de arroz (SASAKI et al., 2008).

Em 1998, foi criado o *The International Rice Genome Sequencing Project* (IRGSP), através de um consócio financiado por laboratórios públicos de 10 países, com o objetivo de seqüenciar o genoma do arroz. Em 2004, o IRGSP conseguiu seqüenciar completamente o genoma do arroz, com 99,99% de precisão (International Rice Genome, 2005; The Rice Annotation Project, 2008).

2.7 Melhoramento genético

Qualquer programa de melhoramento genético de plantas visa obter variedades que permitam a máxima obtenção do produto final, colhido e processado com alta qualidade. O melhoramento genético do arroz não é diferente, e vem contribuindo imensamente nos últimos anos.

A produtividade e a homogeneidade de um estande muitas vezes estão associadas a defeitos agronômicos como menor resistência a pragas, acamamento e/ou baixa qualidade das sementes. Mas esta alta taxa produtiva também está ligada a interação genótipo x ambiente que influencia diretamente na atividade de genes envolvidos no desenvolvimento das plantas.

O melhoramento genético atual tornou-se uma ferramenta indispensável na busca de caracteres que tornem as variedades mais produtivas com diminuição do uso de químicos e poluentes nas áreas de produção. No Brasil, existem muitos órgãos envolvidos diretamente com o melhoramento genético do arroz como Embrapa (*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*), IRGA (*Instituto Riograndense do Arroz*), EPAGRI, entre outros e o instituto internacional IRRI (*International Rice Research Institute*) responsável por manter o Centro Internacional de Germoplasma de Arroz (IRGC).

Várias ferramentas têm sido desenvolvidas para acelerar o processo de desenvolvimento de novos cultivares, combinadas com o melhoramento genético clássico, como a utilização da engenharia genética (MARGIS, 2009). As técnicas modernas de biologia molecular oferecem vantagens que conferem à diminuição do tempo para lançar uma variedade, identificação de genes de interesse a genética e fisiologia de plantas cultivadas, entre elas a cultura *in vitro* e a utilização de marcadores moleculares.

2.8 Marcadores moleculares

De acordo com Malone e Zimmer (2005), os marcadores moleculares são biomoléculas que podem ser relacionadas com uma característica genética fenotípica. Estas biomoléculas podem ser proteínas (antígenos ou isoenzimas) ou DNA. Em termos de variabilidade genética, marcadores moleculares permitem compreender e organizar a variabilidade genética de um programa de melhoramento de forma única, isto é, acessando variabilidade de DNA, que não é influenciado pelo ambiente como são, por exemplo, os caracteres morfológicos e fenotípicos em geral de uma planta.

Marcadores morfológicos apresentam resultados que possibilitam a análise da diversidade indicando o valor adaptativo dos genótipos em um determinado ambiente, porém, suscetíveis à pleiotropia e controle por vários genes simultaneamente. Outro fator limitante desses marcadores é que somente podem ser avaliados na planta após vários anos de seu desenvolvimento em campo (ALFENAS et al., 1998; SHIMIZU et al., 2000).

Os marcadores isoenzimáticos tornaram-se uma importante ferramenta para os estudos genéticos, obtidos através de uma técnica simples, acessível e de análise direta pela identificação de bandas. Contudo, esses marcadores representam uma baixa parcela do genoma (pequeno número de locos e de alelos por loco), podem sofrer interferências ambientais, modificações pós-tradução, e apresentar especificidade para diferentes tecidos, fatos esses que são limitantes para alguns estudos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Como consequência do estudo da variabilidade genética, muitas vezes é possível identificar o padrão molecular (ou *fingerprinting*) de genótipos de interesse, que posteriormente podem ser utilizados para a caracterização de germoplasma, seleção de características de interesse através do mapeamento de genes e QTLs, e análises de diversidade genética (MILACH, 1999). Uma vez que esta informação esteja disponível, é possível selecionar indivíduos com o marcador de interesse, sem avaliar o fenótipo dos mesmos. Esta, também conhecida como seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM).

Os marcadores moleculares têm sido usados para controle da pureza genética de sementes de híbridos ou de linhagens, na certificação e na fiscalização

de sementes. Este fator tem contribuído positivamente na proteção do direito intelectual do melhorista, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos nos países em que vigoram as leis de proteção de cultivares (GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

Até os anos 60, os marcadores utilizados para estudos de genética e melhoramento, eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos utilizando fenótipos de fácil identificação visual como nanismo, deficiência clorofílica, cor de flor e morfologia foliar. A utilização de análise molecular surgiu na década de 70 com a descoberta da tecnologia do DNA recombinante. O aprimoramento de novas tecnologias permitiu isolar e purificar genes específicos, tornando o DNA uma molécula fácil de ser analisada.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram metodologias alternativas para detectar polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. As enzimas de restrição foram empregadas para detectar polimorfismo de fragmentos de restrição pela primeira vez em 1974. Mais tarde, esta estratégia seria combinada com técnicas de hibridizações para criar a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), (MALONE & ZIMMER, 2005), primeiro tipo de marcador molecular que permitiu detectar as diferenças entre indivíduos, diretamente no DNA (GRODZICKER, 1974).

Em meados da década de 80, pesquisadores descobriram um processo simples e eficiente de multiplicar, *in vitro*, em escala exponencial, a quantidade de DNA de certa amostra (MULLIS & FALOONA, 1987), esta metodologia é conhecida como Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Atualmente, a técnica é automatizada, pelo uso de um termociclador e de uma enzima DNA polimerase termoestável, a *Taq* DNA polimerase. Na técnica de PCR, o fragmento de DNA a ser amplificado deve apresentar dois sítios complementares aos *primers* utilizados na reação, sendo que estes sítios devem estar presentes em fitas opostas do DNA a uma distância compatível com a capacidade de extensão de um *primer* até a outra cópia completa do sítio complementar ao outro *primer*, e vice-versa (BOREM & CAIXETA, 2006). A partir desse evento surgiu uma série de novas técnicas de marcadores moleculares, todas utilizando PCR.

Atualmente, as técnicas mais empregadas nos programas de melhoramento e que utilizam a PCR são: a técnica de microssatélite ou SSR (Sequência Simples

Repetidas), a técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), e a técnica de AFLP (polimorfismo de Comprimento de fragmentos amplificados) (MALONE & ZIMMER, 2005).

2.8.1 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

A técnica de AFLP foi desenvolvida com base na decodificação do DNA genômico (VOS et al., 1995). Baseia-se na combinação de outras técnicas, agregando vantagens como especificidade, alta resolução e poder de amostragem da digestão por enzimas de restrição da RFLP, com a aleatoriedade, velocidade e praticidade da PCR e, com a sensibilidade em revelar polimorfismos de alelos da RAPD (BARKER et al., 1999; WANG et al., 2004).

Sua metodologia consiste basicamente em quatro etapas: 1) Clivagem do DNA através de enzimas de restrição; 2) ligação dos adaptadores de DNA fita dupla às extremidades dos fragmentos digeridos que servem de sítios de anelamento do *primer* para a amplificação via PCR; 3) na amplificação seletiva, os fragmentos de DNA ligados aos adaptadores, são submetidos a uma reação de PCR com dois *primers* diferentes que reconhecem a sequência dos adaptadores; 4) os produtos da amplificação são separados em gel de poliacrilamida desnaturante, o qual proporciona alto nível de resolução, podendo ser revelados com auto-radiografia ou coloridos com nitrato de prata.

O número de fragmentos visualizados varia de algumas dezenas até mais de uma centena, o polimorfismo é identificado pela presença ou ausência de bandas (BORÉM & CAIXETA, 2006). O polimorfismo genético a nível de DNA detectado pela técnica de AFLP é resultado de mutações pontuais, inversões, deleções e inserções no DNA, as quais geraram modificações (perdas ou ganhos) nos sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição, alterações na sequência reconhecida pelas bases seletivas no extremo 3' dos *primers* utilizados para a amplificação, ou alteraram o tamanho do fragmento gerado. Estas modificações foram acumuladas ao longo do tempo de evolução de cada espécie (MALONE & ZIMMER, 2005).

Têm sido amplamente utilizado em estudos de diversidade genética (WICHAN et al., 2000; XU et al., 2006), construção de mapas genéticos, identificação e caracterização de cultivares (TESTOLIN et al., 2001; BEEDANAGARI

et al., 2005), registro de cultivares e na busca de marcadores moleculares ligados a características de importância econômica de diversas espécies (RIDOUT & DONINI, 1999).

A desvantagem dos marcadores AFLP é sua herança dominante, que não permite distinguir se o fragmento presente no gel é de origem homozigota ou heterozigota para o *locus*. Entretanto, esta tecnologia apresenta capacidade de analisar, simultaneamente, várias regiões diferentes do genoma, com alto nível de confiabilidade e reprodutibilidade em comparação às técnicas de RAPD e RFLP.

2.9 cDNA – AFLP

A expressão gênica controla respostas biológicas com uma regulação precisa, para isso é necessário o estudo de seus padrões para o esclarecimento dos diferentes processos. Uma variedade de técnicas moleculares está disponível para identificação e clonagem de genes diferencialmente expressos, incluindo RT-PCR e RNA - “*fingerprinting*”. Esses métodos apresentam, entretanto, limitações como, baixa reprodutibilidade, dificuldade em expressar mensagens muito raras, entre outros.

O cDNA–AFLP (BACHEM et al., 1996), é uma melhoria das técnicas tradicionais de exibição diferencial. É uma técnica baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR), e se inicia com a síntese de cDNA que é realizada através da enzima transcriptase reversa, que tem a capacidade de produzir uma molécula de DNA fita dupla a partir da cópia de um RNA mensageiro, sua metodologia inclui a digestão de DNA por duas enzimas de restrição e ligação de adaptadores específicos, onde os *primers* seletivos se ligam, permitindo a amplificação simultânea dos fragmentos.

A tecnologia do cDNA-AFLP apresenta elevado nível de reprodutibilidade e gera um grande número de fragmentos diferencialmente expressos, amplificando fragmentos de 100 a 1000 pb, que são visualizados em gel de poliácridamida, de alta resolução (BREYNE et al., 2003). Além disso a principal vantagem desta técnica é o fato de que ela não necessita de prévio conhecimento da sequência e, dessa forma, é útil para a descoberta de genes ainda desconhecidos (MILIONI et al., BACHEM et al., 1996). Esta tecnologia, tem sido amplamente utilizada na pesquisa da clonagem

na busca de novos genes, perfil de expressão gênica, anotação e funcionalidade de seqüências genômicas, além de ser considerada uma técnica relativamente rápida na acumulação e análise de ESTs e, na descoberta de novos genes funcionais (ABLETT et al., 2000; GAO et al., 2004; ZHAO et al., 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados três genótipos, BRS 7 Taim, ecótipo de arroz vermelho FFS-45 e Nipponbare. Em seguida as sementes foram semeadas em baldes com terra, com aproximadamente 15 sementes por balde, em casa de vegetação situada na estação da Embrapa Clima Temperado – Pelotas (RS) durante o ano agrícola 2008/09. Após atingir a maturidade fisiológica, as sementes foram colhidas manualmente, trilhadas, identificadas, secas e armazenadas em câmara de armazenamento com temperatura controlada. Para garantir um padrão de qualidade somente sementes com alto potencial germinativo e viabilidade acima de 80% foram utilizadas. Valores estes obtidos através dos testes de germinação e primeira contagem da germinação, respectivamente.

3.1 Obtenção do tecido vegetal

Foram colocadas para germinar 20 sementes de cada genótipo para cada época em bandejas plásticas, com areia previamente esterilizada e, para atingir os 15cm de profundidade, foram utilizados tubos de PVC (figura 1). Utilizou – se quatro bandejas com três tubos PVC cada, sendo que cada uma delas representou uma época de coleta e cada tubo um genótipo.

Quatro períodos diferentes de coletas foram pré-estabelecidos, aos quatro dias, aos sete, aos 14 e aos 21 dias após a semeadura, com o objetivo de atingir todas as etapas envolvidas no desenvolvimento das plântulas. Para cada coleta foi utilizado gelo seco a fim de bloquear a atividade dos genes, impedindo a ação destes e para evitar a degradação dos ácidos nucléicos.



FIGURA 1 – Germinação a 15cm de profundidade em bandejas plásticas com areia estéril aos quatro dias após a semeadura, sendo que cada tubo de PVC possui sementes um dos genótipos.

As plântulas foram removidas com a ajuda de um bisturi e alocadas em microtubos de 2,0mL. Após foram estocadas em *ultra freezer* a uma temperatura de -80°C até o momento da extração do RNA.

3.2 Obtenção dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos e avaliação do polimorfismo genético pela técnica de cDNA – AFLP

A técnica para obtenção dos fragmentos de genes consistiu na extração do RNA total; obtenção do cDNA dupla fita; e avaliação do polimorfismo genético pela técnica de cDNA – AFLP.

3.3 Extração do RNA total

Para extração do RNA total dos genótipos de arroz, realizou-se primeiramente a esterilização de todas as vidrarias, cadinhos, pistilos, ponteiras, microtubos e demais utensílios em autoclave por 45 minutos a 130°C. Todos os reagentes necessários foram feitos com água contendo 0,01% de dietilpirocarbonato (H_2O_{DEPC}), para evitar a ação de enzimas que degradam o RNA (RNases).

O protocolo para extração foi realizado utilizando o reagente *TRIZOL* (*Invitrogen*®), seguindo o protocolo a seguir:

Utilizando nitrogênio líquido, as plântulas foram trituradas em cadinhos, e pesadas 100mg de cada amostra obtida e colocadas em microtubos de 2,0mL. Após foi adicionado 1mL de *Trizol reagent* em cada amostra e os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo agitados por inversão a cada 2 minutos. A seguir adicionou-se 1μL de glicogênio e as amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 12.000 x g. Esta etapa é importante para a separação do RNA total de proteínas e outros materiais indesejáveis. O sobrenadante foi recuperado em um volume de 500μL, e adicionado 200μL de clorofórmio para solubilizar os lipídeos. Após 15 minutos no *vortex*, as amostras foram incubadas por 7 minutos a temperatura ambiente e, logo depois centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 12.000 x g.

Para precipitação do RNA, a fase aquosa foi removida para um novo tubo contendo 250μL de isopropanol e 137,5μL de solução de citrato de sódio e mesmo volume de NaCl, misturados gentilmente no *vortex* e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugou-se as amostras a 4°C por 10 minutos a 12.000 x g. A última etapa foi a de lavagem do RNA onde se descartou o sobrenadante, e foi adicionado 1mL de etanol 70%, centrifugados por 5 minutos a 7.000 x g. Após a centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado para remover totalmente o etanol, o RNA foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos e o *pellet*, contendo RNA, foi dissolvido em 15μL de água DEPC.

Cabe ressaltar que todos os reagentes utilizados estavam armazenados a 4°C antes de sua utilização. As extrações foram realizadas separadamente para cada época e para cada genótipo, totalizando 12 amostras.

3.3.1 Purificação do RNA

O RNA total extraído foi purificado com *DNase I Amp Grade (Invitrogen®)* seguindo recomendações do fabricante. A *DNase I Amp Grade (Invitrogen®)* tem por função digerir fitas simples ou duplas de DNA eliminando-as durante a extração de RNA.

A pureza e a integridade do RNA extraído foram mensuradas através de análise de absorbância (260/280nm) e eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK et al., 2001).

3.4 Obtenção do cDNA

O cDNA dupla fita foi sintetizado utilizando o *SuperScript Double Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen®)*, conforme fabricante.

3.4.1 Síntese da primeira fita de cDNA

Para síntese da primeira fita de cDNA, foi feito um *bulk* das quatro épocas para cada amostra (2.5µL de RNA total de cada época), e acrescentados 10µL de H₂O_{DEPC} em 25µg de RNA total. Em seguida, adicionou-se 1µL de *primer* Oligo dT (concentração de 100pmol/µL). Esta mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos, e logo após colocou-se rapidamente os tubos no gelo. Na etapa seguinte foi feita uma breve centrifugação e adicionados os seguintes componentes: 4µL de tampão de reação da primeira fita 5X [Tris-HCl 250mM (pH 8.3), KCl 375mM, MgCl₂ 15mM], 2µL de DTT (0,1M) e 1µL de dNTP (10mM). Esta mistura foi obtida no *vortex*, e incubou-se por 2 minutos a 45°C e, depois acrescentou-se 1µL de *SuperScript II RT*, incubando-se novamente a amostra (45°C por 1h). Para finalizar a reação, as amostras foram colocadas no gelo.

3.4.2 Síntese da segunda fita de cDNA

Com as amostras no gelo, adicionou-se 20µL da reação da primeira fita, com os seguintes *componentes*: 91µL de H₂O_{DEPC}, 30µL de tampão de reação da segunda fita 5X [Tris-HCl 250mM (pH 6,9), MgCl₂ β-NAD⁺ 450mM, (NH₄)₂SO₄ 50mM], 3µL de dNTP (10mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1µL de DNA Ligase da *E. coli* (10U/µL), 1µL de DNA Polimerase da *E. coli* (10U/µL), RNase H da *E. coli* (2U/µL). A mistura foi obtida em *vortex* e incubada (16°C por 2h). Em seguida, adicionou-se 2µL (10 unidades) de T₄ DNA Polimerase e incubou-se por mais 5 minutos. As amostras foram transferidas para o gelo, e 10µL de EDTA (0,5M) juntamente com 160µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram acrescentados e homogeneizados gentilmente em *vórtex* e centrifugados a temperatura ambiente (5 minutos a 14.000 x g). Removeu-se 140µL do

sobrenadante e transferiu-se para um novo tubo de microcentrífuga e, a seguir foram adicionados 70µL de NH₄OAc (7,5M) e 0,5mL de etanol absoluto gelado. A mistura foi obtida em *vortex* e imediatamente centrifugou-se por 20 minutos nas condições descritas anteriormente. Removeu-se o sobrenadante lavando-se o *pellet* em etanol 70% gelado, centrifugou-se a temperatura ambiente (2 minutos a 14.000 x g) e o sobrenadante foi descartado. O cDNA obtido foi incubado a 37°C para evaporar o resíduo de etanol e depois, o *pellet* foi dissolvido em 6µL de H₂O_{DEPC}.

3.5 cDNA-AFLP

A técnica de cDNA-AFLP foi proposta por Bachem em 1996, e é composta pelas etapas de digestão do cDNA com enzimas de restrição (*EcoR* I e *Mse* I), ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos de cDNA, gerados pela clivagem, pré-amplificação dos fragmentos de restrição utilizando os *primers* (*EcoR* I +**A** e *Mse* I +**C**), amplificação seletiva dos fragmentos utilizando três bases seletivas e eletroforese dos fragmentos de cDNA amplificados em gel de poliacrilamida. Para execução dessa técnica utilizou-se o *AFLP Starter Primer Kit* (*Invitrogen*[®]), conforme instruções do fabricante. Os passos de cada etapa serão detalhados a seguir.

3.5.1 Reação de digestão do cDNA

Em um tubo de microcentrífuga, foram adicionados os seguintes componentes: 3µL de tampão de reação 5X [Tris-HCl 50mM (pH 7,5), acetato de magnésio 250mM, acetato de potássio 50mM], 4µL de cDNA (150ng), 1,2µL *EcoR* I/*Mse* I [1,25µ/ (pH 7,5), NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, 0,1mg/µL BSA, glicerol 50% (v/v), 0,1% Triton[®] x-100], 6,8µL de água ultra pura. Essa mistura foi homogeneizada e centrifugada brevemente, em seguida incubou-se as amostras (37°C por 2 horas) e depois novamente foram incubadas (70°C por 15 minutos) para inativar a restrição por endonucleases. O último passo foi colocar o tubo no gelo e coletar o conteúdo por centrifugação breve.

3.5.2 Ligação de adaptadores

Ao cDNA digerido proveniente da etapa anterior, adicionou-se 14,4µL de solução de ligação de adaptadores [EcoR I/Mse I, ATP (0,4mM), Tris-HCl 10mM (pH 7,5), acetato de magnésio 10mM, acetato de potássio 50mM] e 0,6µL de T4 DNA Ligase [1µ/µL em Tris-HCl 10mM (pH 7,5), DTT 1mM, KCl 50mM, glicerol 50% (v/v)]. A mistura foi homogeneizada, centrifugada brevemente e incubada (20°C por 2 horas). Em seguida, realizou-se uma diluição da solução de ligação de 1:10 colocando 5µL da reação de ligação e acrescentando 45µL de tampão TE [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM].

3.5.3 Pré-amplificação

Em um microtubo de 0,2mL, foram adicionados 3µL de cDNA diluído da etapa anterior, 20µL do *primer mix* pré-amplificação, 2,5µL de tampão da PCR 10X+Mg [Tris-HCl 200mM (pH 8,4), MgCl₂ 15mM, KCl 500mM] e 0,5µL da enzima *Taq* DNA Polimerase (5µ/µL). Em seguida as amostras foram levadas ao termociclador utilizando-se a seguinte programação: 20 ciclos de 94°C por 30s; 56°C por 60s e 72°C por 60s. Após a reação de PCR, realizou-se uma diluição das amostras pré-amplificadas, transferindo-se 3µL das mesmas e adicionando-se 147µL de tampão TE [Tris-HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 0,1mM].

3.5.4 Amplificação Seletiva

Na reação de amplificação seletiva, foram testadas 16 combinações de *primers*, as quais estão assinaladas na Tabela 1.

Tabela 1 – Combinações de *primers* utilizados nas reações de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP.

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E- AAC								
E-AAG		√					√	
E-ACA	√							√
E-ACC		√				√		
E-ACG				√				
E-ACT					√	√	√	
E-AGC	√	√		√	√			
E-AGG		√	√					

Para cada par de *primer* escolhido foi necessário o preparo das seguintes soluções:

O **MIX 1** composto por 1,0μL do *primer EcoR I* + 9,0μL do *primer Mse I* (contendo dNTPs), totalizando um volume de 10μL (suficiente para 2 reações de amplificação).

O **MIX 2** contendo 15,8μL de água destilada + 4,0μL de tampão de PCR (10X+Mg) + 0,2μL de *Taq DNA Polimerase* (5μ/μL) com volume final de 20μL (suficiente para 2 reações de amplificação). E, finalmente o **MIX 3** contendo 5μL de cDNA diluído + 5,0μL de mix 1 + 10μL de mix 2 com volume final de 20μL (suficiente para 2 reações de amplificação).

Após o preparo das reações da amplificação seletiva, as amostras foram levadas para o termociclador (PTC 100-MJ Research) com a programação conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Programação do termociclador utilizada para reação de amplificação seletiva na técnica de cDNA-AFLP.

Programa	T(°C)	Tempo(s)	T(°C)	Tempo(s)	T(°C)	Tempo(s)	Nºciclos
1	94	60	65	60	72	90	1
2	94	60	64	60	72	90	1
3	94	60	63	60	72	90	1
4	94	60	62	60	72	90	1
5	94	60	61	60	72	90	1
6	94	60	60	60	72	90	1
7	94	60	59	60	72	90	1
8	94	60	58	60	72	90	1
9	94	60	57	60	72	90	1
10	94	60	56	60	72	90	1
11	94	30	56	30	72	60	23

3.6 Detecção dos fragmentos de genes diferencialmente expressos

Para visualização dos fragmentos de genes diferencialmente expressos, obtidos através da técnica de cDNA, realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida com 5% de concentração, revelado com nitrato de prata. Essa metodologia é a mais utilizada para separação de proteínas e moléculas de pequeno tamanho. No caso da técnica de AFLP, utilizam-se géis do tipo desnaturante, que realizam a separação de fragmentos de cDNA de fita simples.

3.7 Preparo e montagem das placas

O gel de acrilamida foi preparado entre duas placas de vidro de tamanhos diferentes, entre elas foram colocados espaçadores de 2mm de espessura que permitem a passagem da solução do gel. A placa maior recebeu tratamento com uma solução de *Bind silane* (1mL) que tem por função fazer o gel permanecer aderido a placa no momento da revelação, enquanto que a placa menor recebeu

tratamento com uma solução repelente de *Repel silane* (1mL) que permite a separação da placa menor com facilidade sem prejudicar o gel após a eletroforese.

3.8 Preparo da solução do gel de poliacrilamida (5%)

A solução do gel foi preparada em béquer utilizando-se 27g de uréia , 12mL de tampão TBE 5X [54g de Tris-base, 27,5g de Ácido Bórico, 20mL EDTA 0,5M (pH 8,0), completou-se com água deionizada ate 1L e ajustou-se o pH do tampão até próximo a 8,3]; 9mL de acrilamida:bisacrilamida 19:1 (38g de acrilamida, 2g de bisacrilamida e completou-se para 100mL); água deionizada suficiente para completar 60mL.

Os componentes foram dissolvidos em agitador magnético até a diluição total da uréia. Depois de a solução pronta, foi colocada para esfriar e acrescentou-se 432µL de APS (Persulfato de Amônio 10%) e 86,4µL de TEMED, e imediatamente verteu-se a solução no molde do gel.

Após a polimerização do gel (em torno de 1h), realizou-se uma pré-corrida de aproximadamente 30minutos a potência constante de 60W. Em seguida, foi realizada a limpeza da região superior do gel injetando solução tampão com auxilio de uma seringa e os pentes foram fixados no molde. As amostras foram desnaturadas (94°C por 10 minutos), utilizando igual volume de tampão de desnaturação (*loading buffer*). Em seguida as amostras foram imediatamente resfriadas a 4°C e aplicadas em triplicata no gel.

As placas foram retiradas da cuba após 2h40min de corrida (60W), separadas com auxilio de uma espátula e então iniciou-se o processo de revelação.

3. 9 Revelação do gel utilizando Nitrato de Prata - (BLEIDER, 1992 - modificado)

Esse método de revelação é baseado na oxidação do nitrato de prata, ligado aos fragmentos de cDNA amplificados, presentes no interior do gel.

Após a separação das placas, a placa maior contendo o gel foi colocada em solução fixadora 1, durante 20 minutos sob agitação orbital leve. Eliminou-se a solução fixadora 1 e 2 lavagens de 5 minutos com água destilada foram feitas. Descartou-se a água de lavagem e em seguida foi acrescentada a solução fixadora

II deixando sob agitação leve por 3 minutos. Após o descarte da solução fixadora II foram realizadas 2 lavagens de 5 minutos com água destilada. Em seguida acrescentou-se a solução de nitrato de prata, deixando sob agitação orbital leve por 30 minutos. Eliminou-se essa solução e procedeu-se uma lavagem rápida de 30 segundos com água destilada. Após eliminar a água de lavagem, foram adicionados 500mL da solução reveladora gelada (4°C) até adquirir uma coloração escura. Quando as primeiras bandas começaram a aparecer, os 500mL foram descartados e o restante da solução reveladora foi adicionada deixando em agitação orbital constante até o completo aparecimento das bandas. Retirou-se a solução reveladora e imediatamente a solução finalizadora foi acrescentada, ficando em agitação orbital leve por 10 minutos. Descartou-se a solução finalizadora e uma última lavagem com água destilada foi feita. Após a retirada da água destilada, aguardou-se a secagem do gel para que fosse possível fazer a identificação das bandas polimórficas.

3.9.1 Preparo das soluções para revelação com nitrato de prata

Para o preparo de dois litros de cada solução utilizada, foram necessários os seguintes componentes:

Solução fixadora I: 100mL de etanol (PA), 10mL de ácido acético (PA) e completou-se o volume com água destilada;

Solução Fixadora II: 15mL de ácido nítrico e completou-se o volume com água destilada;

Solução de Nitrato de Prata 2%: 4g de nitrato de prata foram dissolvidos em água destilada (50mL aproximadamente) e depois completou-se o volume com água destilada;

Solução Reveladora: 60g de carbonato de sódio foi dissolvido em 500mL de água destilada, sob agitação constante, completando-se o volume com água destilada gelada (4°C). Imediatamente antes da utilização da solução reveladora, acrescentou-se 1mL de formaldeído;

Solução Finalizadora: 200mL de ácido acético 10% e completou-se o volume com água destilada.

3.10 Interpretação dos resultados

Os resultados foram avaliados devido à presença e/ou ausência de fragmentos separadamente em cada genótipo, e avaliação da intensidade de bandas presente nos três genótipos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O RNA total extraído das plântulas obtidas das sementes germinadas aos 4, 7, 14 e 21 dias após a semeadura, pode ser visualizado na fig. 2 (A).

A concentração das amostras nas duas primeiras épocas de coleta (4 e 7 dias), pode estar diretamente ligada a atividade metabólica intensa do organismo nesta fase de diferenciação, divisão celular e síntese de RNAs. De acordo com Mertz et al. (2009), a qualidade e integridade do RNA extraído são pontos críticos para obtenção de cDNA representativo dos genes expressos provavelmente mais importantes que o rendimento. De acordo com a fig. 2 (B), é possível observar a qualidade do cDNA sem a necessidade de isolamento prévio do RNA mensageiro.

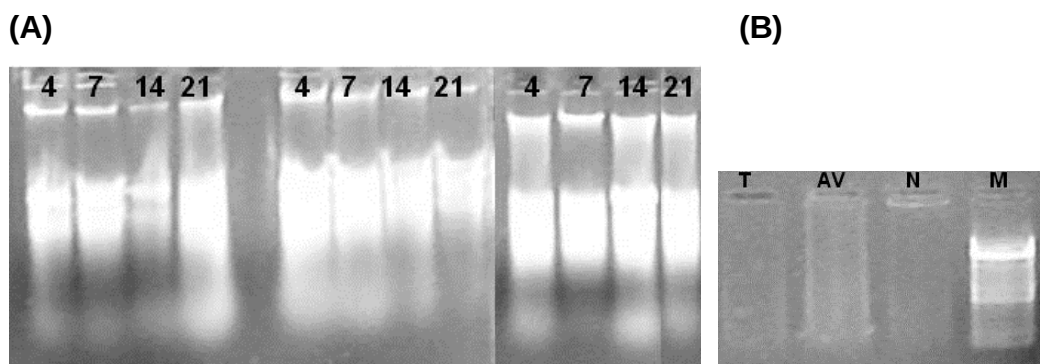


Figura 2 – **(A)** RNA total extraído utilizando reagente *Trizol*, visualizado em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio. As quatro primeiras canaletas a correspondem ao RNA total da cultivar BRS 7 Taim identificada pelas épocas de semeadura 4, 7, 14 e 21 dias, seguida pelas amostras do ecótipo de arroz vermelho (FFS-45) e da variedade Nipponbare, respectivamente. **(B)** Padrão de cDNA obtido após *bulk* de RNA total de cada época de semeadura, visualizado em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio, identificados através das letras T- BRS 7 Taim; AV – arroz vermelho; N – Nipponbare e M – marcador de peso molecular.

Das 16 combinações de *primers* utilizadas, somente três (*E-AGC / M-CAC*, *E-AAG / M-CTG* e *E-ACA / M-CTT*) não apresentaram amplificação. Este fato justifica-se porque a técnica de AFLP é baseada em combinações aleatórias de *primers*, podendo ocorrer incompatibilidade de reconhecimento com as seqüências formadas pelas amostras, ou seja, não produzindo bandas.

Mertz (2007), utilizando a mesma técnica para estudo do polimorfismo em tegumentos de sementes de soja não encontrou polimorfismo em algumas combinações testadas, corroborando com Ferrari (2008) que avaliando a expressão diferencial de mutantes de arroz com estresse de temperatura, observou também que algumas combinações de *primers* não amplificaram.

Das combinações restantes, foi possível identificar 95 fragmentos diferencialmente expressos relacionados aos genótipos pesquisados, sendo que 20 destes foram identificados no *primer E-AGC / M-CTA*.

A avaliação dos resultados foi feita através da observação dos fragmentos presentes individualmente em cada genótipo, na presença entre eles e na comparação de intensidade de bandas presentes nas três variedades.

A figura 3 mostra a análise individual do cultivar BRS 7 “Taim”, que permitiu a identificação de 26 fragmentos diferencialmente expressos. A variabilidade genética do arroz cultivado é comprovada em inúmeros projetos de pesquisa direcionados ao melhoramento de plantas na busca de variedades mais resistentes, visando aumento de produtividade segundo Goff et al.(2002) e Yu et al. (2002).

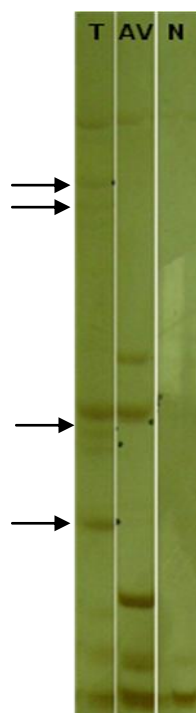


Figura 3 – Fragmentos diferencialmente expressos presentes somente na cultivar BRS 7 “Taim”, separados em gel de poliacrilamida 5% corado com Nitrato de Prata, obtidos através da técnica de cDNA – AFLP utilizando a combinação de *primers* E-AGC / M-CTA. As setas indicam alguns dos fragmentos identificados.

No ecótipo de arroz vermelho FFS-45, foi possível identificar 41 fragmentos diferencialmente expressos, tanto polimórficos como monomórficos. O elevado número de fragmentos contrastantes apresentados pelo ecótipo de arroz vermelho comprova sua alta variabilidade genética que pode estar relacionada ao caráter germinação/emergência, como pode ser observado na figura 4.

Esses resultados estão de acordo com resultados obtidos por Malone et al. (2007). Segundo Olsen et al. (2007) o arroz vermelho mantém um acervo de genes que o arroz cultivado perdeu durante o processo de seleção à que foi submetido na busca de adaptabilidade e produtividade. Segundo os mesmos autores, embora o arroz vermelho apresente características fenotípicas altamente variáveis, mantêm traços genéticos de espécies ainda não domesticadas.

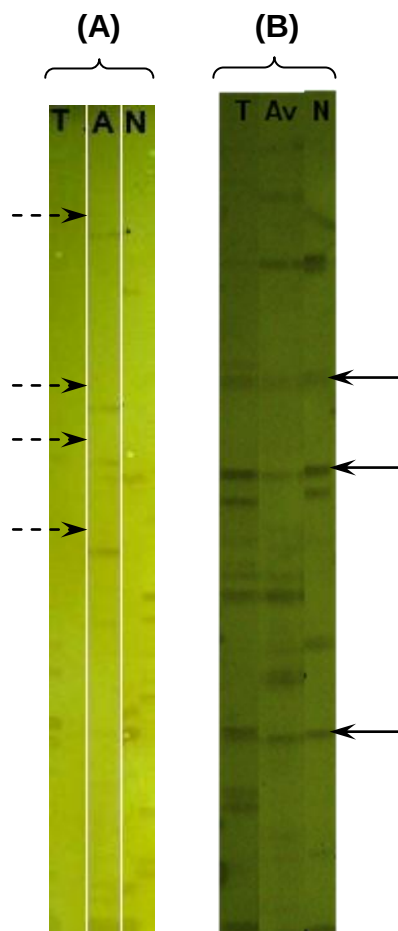


Figura 4 – Separação de fragmentos através da técnica de cDNA-AFLP em gel de poliacrilamida 5%, corado com Nitrato de Prata. Os fragmentos foram obtidos utilizando as combinações de *primers* **(A)** *E*-AGG / *M*-CAG, **(B)** *E*-ACC / *M*-CAC. As setas pontilhadas indicam alguns dos fragmentos identificados no ecótipo de arroz vermelho, e as setas contínuas indicam fragmentos presentes nos três genótipos.

Ainda relacionado à variabilidade do arroz vermelho, Shivrain et al. (2007) obteve, através do uso de marcadores microssatélites, alta taxa de fluxo gênico entre acessos de arroz vermelho silvestres e arroz CL.

De acordo com Malone et al. (2007) o arroz vermelho possui um elevado grau de polimorfismo, comprovado pelo uso de marcadores microssatélites e isoenzimas. Os fragmentos encontrados somente no ecótipo FFS-45 possivelmente estão relacionados com a capacidade de desenvolvimento das plantas de arroz vermelho em condições de estresse de profundidade de semeadura, conferindo-lhes um desempenho superior ao arroz cultivado.

Na literatura, alguns autores observaram que a distribuição de sementes de plantas daninhas no perfil do solo é influenciada por sistemas de semeadura, e estas diferenças ocorrem principalmente na superfície do solo (Carmona et al., 1992). Nesse sentido, Helpert et al. (1981) constatou que 12% das sementes de arroz vermelho semeadas a 12cm de profundidade germinaram, e Gealy et al. (2000), testando a emergência de diversos ecótipos de arroz vermelho em diferentes texturas de solo até 7,5cm de profundidade verificaram que todos emergiram de maneira uniforme. Avila et al. (2000) e Noldin et al. (1995), verificaram que sementes de arroz vermelho germinam bem a grandes profundidades mas perdem sua viabilidade rapidamente quando estão na superfície do solo (SGUAREZI et al., 2004). Outras espécies apresentam a mesma característica quando submetidas ao estresse, segundo Paulino et al. (2004), avaliando efeitos de estresse hídrico e de profundidade de semeadura em sementes de *Brachiaria brizantha*, definiu que quanto maior a profundidade de semeadura, maior a umidade e conseqüentemente maior a possibilidade de absorção de água pela gluma da semente, caracterizando a fase I da germinação e posterior emergência. Prado et al. (2001), considera que a baixa densidade de plantas na cultura do milho, ocorre em razão de problemas com a época da semeadura, seja pelo uso de um número inadequado de sementes ou pelo contato insuficiente solo-semente, que normalmente implica em pouca uniformidade da cultura, fato que tem sido observado no estabelecimento de lavouras, mesmo quando se utilizam sementes de alto poder germinativo.

As subespécies de arroz, *índica* e *japônica*, apresentam diferenças visíveis morfológicamente, como a forma da semente e têm sido bastante exploradas na identificação de características de interesse ao melhoramento da qualidade fisiológica. Mackili et al. (1995), analisando o polimorfismo entre as subespécies *japônica* e *índica* através de diversos marcadores moleculares, concluíram que o nível de polimorfismo do arroz japonico é relativamente baixo comparado ao índico. Isto remete ao baixo número de fragmentos observados exclusivamente na cultivar Nipponbare, que permitiu separar sete bandas. Este número reduzido pode ser explicado devido à grande semelhança com os outros genótipos estudados já que serve de modelo, por ter seu genoma totalmente seqüenciado, para a caracterização funcional dos genes.

Quanto à similaridade entre as espécies cultivadas e daninhas Sylvio (2009), afirma que ambas apresentam características fisiológicas e bioquímicas parecidas, concordando com resultados encontrados neste trabalho, refletidos na expressão de fragmentos presentes nas três variedades ilustrados pela figura 4 (setas pretas). A sensibilidade e especificidade do método de cDNA-AFLP permitem a detecção de genes pouco expressos, e a determinação de diferenças sutis na atividade transcricional. Alguns fragmentos presentes nos três genótipos apresentaram diferença na intensidade de bandas, como pode ser observado na figura 5 que evidencia bandas mais intensas na cultivar BRS 7 Taim.

Segundo Breyne et al. (2003), devido ao uso de géis de alta resolução, as diferenças na intensidade das bandas que podem ser observadas, fornecem uma boa medida da diferença relativa nos níveis de expressão do gene. Estes fragmentos mais intensos comprovam que alguns genes podem ter sua atividade acentuada em determinado estágio de desenvolvimento da plântula, sendo que estas podem representar respostas a fatores ambientais, como estresses ou tolerância. Esse processo pode interferir no desempenho foliar e radicular das plântulas, demonstrada claramente no potencial e na velocidade de germinação das sementes de arroz vermelho que apresentaram parte vegetativa mais vigorosa que os demais cultivares em todas as épocas de coleta.

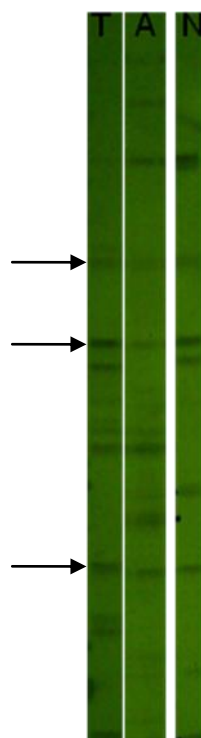


Figura 5 – Identificação de fragmentos com expressão diferencial na intensidade de bandas, separados em gel de poliacrilamida 5%. As letras T, A e N representam, respectivamente, as cultivares BRS 7 Taim, ecótipo de arroz vermelho FFS-45 e Nipponbare. As setas indicam a seqüência de bandas presentes nos três genótipos, sendo que a cultivar Taim apresenta-se mais intensa.

A técnica de cDNA - AFLP permite identificar fragmentos de diferentes pesos moleculares numa escala de 100 a 1000pb. As bandas observadas, indiferentes das combinações de *primers*, apresentaram peso molecular entre 200 e 100pb, o que confere com outros trabalhos que utilizaram a mesma técnica em arroz (FERRARI, 2008).

A caracterização de fragmentos de genes possibilitará a identificação de genes envolvidos no processo de germinação / emergência, possibilitando o conhecimento das funções destes, e de enzimas envolvidas em rotas metabólicas que participam deste processo. Isto permitirá o desenvolvimento de marcadores moleculares associados ao desempenho durante a germinação / emergência do arroz e, num futuro próximo, os programas de melhoramento genético do arroz e de outros cereais, poderão utilizar essas informações para o desenvolvimento de genótipos com desempenho superior para este caráter através da seleção assistida.

CONCLUSÕES

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

Há diferenças na intensidade da expressão gênica no momento da germinação / emergência.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLETT, E.; SEATON, G.; SCOTT, K., et al. Analysis of grape ESTs: global gene expression patterns in leaf and berry. **Plant Science**. v.159, p 87–95, 2000.

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

APASSUL - ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RS. Disponível em: < <http://www.apassul.com.br/> > Acesso em: 07 Dez 2009.

AVILA, L. A., ANDRES, A.; MARCHEZAN, E.; MENEZES, V.G. Banco de Sementes de Arroz Vermelho em Sistemas de Semeadura de Arroz Irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.5, p.773-777, 2000.

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

BARKER, J.H.A., MATTHES, M., ARNOLD, G.M., EDWARDS, K.J., AHMAN, I., LARSSON, S., KARP, A. Characterization of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix* spp.) by RAPD and AFLP analyses. **Genome**, v 42. p.173–183. 1999.

BEEDANAGARI, S.R., DOVE, S.K., WOOD, B.W., CONNER, P.J. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** v.110, n. 6, p.1127–1137, 2005.

BEIDLER, J.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L. Ultra sensitive staining of nucleic acids with silver nitrate. 1982.

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

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

BORÉM, Aluizio. Melhoramento do Arroz. In: **Melhoramento de Espécies Cultivada**. Viçosa: Ed. UFV, 2005. p. 103-106.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Tipos de Marcadores Moleculares. In: **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Ed. UFV, 2006. p. 09-78.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regras para Análise de Sementes. Brasília: Departamento Nacional de Produção Vegetal. 2009. p.398.

BREYNE, P. *et al.*, Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. **Molecular Genetics and Genomics**, n.269, p.173–179, 2003.

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

CARMONA, R. Problemática e manejo de bancos de sementes de invasoras em solos agrícolas. **Planta Daninha**, v. 40, n. 12, p. 5-16, 1992.

CHANG, T. T. **The rice cultures**. Phil. Trans. R. Soc. London, 275: 143-157. 1976.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>> Acesso em 10 Dez 2009.

CRAIGMILES, J.P. Red rice, research and control. **Tex. Agric. Exp. Stn. Bull.** No. 127, pp. 5–6, 1978.

DORNELLES, S.H.B. **Caracterização de acessos polimórficos de arroz vermelho do Rio Grande do Sul por descritores morfológicos e microsatélites**. 2009. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

ELEFTHEROHORINOS, I.G., DHIMA, K.V., VASILAKOGLU, I.B. Interference of red rice in rice grown in Greece. **Weed Sci.** V. 50, p.167–172, 2002.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: < <http://www.cnpaf.embrapa.br> > Acesso em: 10 Dez 2009.

FAOSTAT – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> > Acesso em: 10 Dez 2009.

FARSUL – FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: < <http://www.farsul.org.br/> > Acesso em: 06 Dez 2009.

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

FERREIRA, M.E. 2003. Melhoramento Genético de Arroz: impactos da genômica. In: **Melhoramento Genômico**. Eds. BORÉM, A.; GIUDICE, M.; SEDIYAMA, T. Universidade Federal de Viçosa, p. 73-129.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p. 220, 1998.

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

GAO, R.J. ; DAI, D.P. ; MA, R.C. et al. Express sequence tags (EST) analysis of the heading leaf of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) at the early heading stage. **Journal of Agricultural Biotechnology**. v.12, p.24–29, 2004.

GEALY, D. R.; SALDAIN, N. E.; TALBERT, R. E. Emergence of red rice (*Oryza sativa*) ecotypes under dry-seeded rice (*Oryza sativa*) culture. **Weed Technol.**, v. 14, n. 2, p. 406-412, 2000.

GOFF, S. A.; RICHE, D.; LAN, RH. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). **Science**, v. 296, p. 92-100, 2002.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBOOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations adenoviruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. n.39, p.439-446, 1974.

GUI, F.R.; GUO, J.Y.; WAN, F.H.. Application of ISSR molecular marker in invasive plant species study. **The journal of applied ecology**. v.18, n.4, p.919-27, 2007.

GUIMARAES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BOREM, A. (Ed). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, p. 715-740, 1999.

HARLAND, J.R. Crops and man. Amer. Soc. Agrono. Madison, Wisconsin.p.14-18, 1975.

HARUSHIMA Y, YANO M, SHOMURA A, SATO M, SHIMANO T, KUBOKI Y, YAMAMOTO T, LIN SY, ANTONIO BA, PARCO A, KAJIYA H, HUANG N, YAMAMOTO K, NAGAMURA Y, KURATA N, KHUSH GS, SASAKI T. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. **Genetics**. v.148, n.1, p.479-94,1998.

HELPERT, C. W. Dormancy, germination, and emergence of red rice (*Oryza sativa* L.). 1981, 92f. Thesis (Ph.D. Dissertation in Agronomy) – Texas A&M University, Texas.

IRGA - INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>> Acesso em: 08 Dez 2009.

JING, C.H.; BAYON, C.; KANYUKA, K.; BERRY, K.; WENZL, P.; HUTTNER, E.; KILIAN, Z.; KOSACK, K.H. DarT markers: diversity analyses, genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in *Triticum monococcum*. **BMC Genomics**, v.10, n.458, 2009.

LACERDA, A.L.S. **Banco de sementes de plantas daninhas**. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/plantas_daninhas/index.htm>. Acesso em: 10/01/2010.

LI, K.; WU, W.; ZHENG, Y.; DAI, Y.; XIANG, L.; LIAO, K.. Genetic diversity of *Fritillaria* from Sichuan province based on ISSR. **China journal**. v.34, n.17, p.2149-54, 2009.

LIU, R.H.; MENG, J.L. RFLP and AFLP Analysis of Inter- and Intraspecific Variation of *Brassica rapa* and *B. napus* Shows that *B. rapa* Is an Important Genetic Resource for *B. napus* Improvement. **Acta Genetica Sinica**. V.33, N.9, 2006.

MARCHEZAN, E.; OLIVEIRA, A.P.B.B.; AVILA, L.A.; BUNDT, A.L.P. dinâmica do banco de sementes de arroz-vermelho afetado pelo pisoteio bovino e tempo de pousio da área. **Planta Daninha**. Viçosa-MG, v.21, n.1, p.55-62, 2003.

MACKILI, D.J.; ZHANG, Z.; REDONA, E.D. Comparison of AFLP, Microsatellite and RAPD Marker Polymorphism in Rice. **Rice Genetics Newsletter**. v.12, p. 245, 1995.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D. Marcadores Moleculares. In: **Ferramentas da Biotecnologia no Melhoramento Genético Vegetal**. Pelotas: Ed. Gráfica Universitária, p. 77-105, 2005.

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

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; CASTRO, A.da S. de; PESKE, S. T. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de Germinação/Emergência em arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, 2006.

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

MARCUS FILHO, J. Germinação. In: **Fisiologia de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: Ed. FEALQ, p. 197-249, 2005.

MARGIS, M. P. A biotecnologia na agricultura: o melhoramento genético do arroz. **Conselho de Informações sobre Biotecnologia**. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/>> Acesso em: Dez 2009.

MATSUO, T., FUTSUHARA, Y., KIKUCHI, F., YAMAGUCHI, H. Science of the Rice Plant. **Food and Agriculture Policy Research Center**, Tokyo, 1997.

MERTZ, L.M.; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. cDNA-AFLP na identificação de genes relacionados a qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 2, p.048-053, 2009.

MERTZ, Liliane Márcia. **Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante**. 2007. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MILACH, S.C.K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

MILIONI, D.; SADO, P.E.; STACEY, N.J.; ROBERTS, K.; MCCANN, M.C. Early gene expression associated with the commitment and differentiation of a plant tracheary element revealed by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis, **Plant Cell**. n.14, p.2813–2824. 2002.

MORISHIMA, H. Wild Genitors of Cultivated Rice and their Population Dynamics. In: **Rice Genetics: Proceedings of the International Rice Genetics Symposium**, 27-31 may 1985. Manila: IRRI. p. 3-14, 1986.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**. n.55, p.335-350, 1987.

NETO, Austecínio. A Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas – Regional DF. In: **Pré-Melhoramento, Melhoramento e Pós-Melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina: Ed. Embrapa cerrados, p. 19-20. 2008.

NOLDIN, J.A. Characterization, seed longevity, and herbicide sensitivity of red rice (*Oryza sativa* L) ecotypes, and red rice control in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. Texas, 1995. 218p. Thesis (PhD) – Texas A&M University, 1995.

NOLDIN, J.A., CHANDLER, J.M., McCAULEY, G.N. Red rice (*Oryza sativa*) biology. I. Characterization of red rice ecotypes. **Weed Technology**, v.13, n.1, p.12-18, 1999.

OKA, H. Experimental Studies on the Origin of Cultivated Rice. **Genetics**. V. 78(1): 475–486, 1974.

OLSEN, K.M.; CAICEDO, A.L.; JIA, Y. Evolutionary Genomics of Weedy Rice in the Usa. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 811-116, 2007.

PAULINO, T. S.; TSUHAKO, A. T.; PAULINO, V. T. Efeito do estresse hídrico e da profundidade de semeadura na emergência de *Brachiaria brizantha* CV. MG-5. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Ano III, n. 5, 2004.

PESKE, S.; LUCCA FILHO, O.; BARROS, A. C. S. A. Fundamentos da Qualidade da Semente. In: **Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos**. Pelotas: Ed. Editora e Gráfica Universitária, 2006. p. 100-158.

PESKE, S.T.; BARROS, A. C. S. A.; NUNES, M. M.; FERREIRA, L. H. Sobrevivência de sementes de arroz vermelho depositadas em solo. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 3, n. 1, p. 17-22, 1997.

PESKE, S.T.; PERRETO, E.; GALLI, J. Avaliação de sementes e plantas de arroz daninho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 15, n.1, p. 49-54, 1993.

PRADO, R. M. de.; TORRES, J. L.; ROQUE, C. G.; COAN, O. Semente de milho sob compressão do solo e profundidade de semeadura: influência no índice de velocidade de emergência. **Scientia Agrária**, v.2, n.1/2, p.45-49, 2001.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A. In: *Genética na Agropecuária*. Lavras: Ed. UFLA, p.463, 2008.

RAMALHO, M.P. Genetic Improvement and Agribusiness in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, p. 127-134, 2004.

RIDOUT, C.J; DONINI, P. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM & CAIXETA (Ed.). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, p.09-74, 1999.

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

SASAKI, T.; WU, J.; MIZUNO, H.; ANTONIO, B. A.; MATSUMOTO, T. The Rice Biology in the Genomics Era. In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlim: Ed. Springer-Verlag, v.12, 2008.

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

SGUAREZI, C.N.; PESKE, S.T.; ZIMMER, P.D.; MALONE, G.; VIEIRA, E.A. 19º Seminário Panamericano de Semillas, **Abstracts** Assunción – PY, Sessão 4, p. 310, Julho de 2004.

SHIMIZU, J.Y.; JALGER, P.; SOPCHAKI, S.A. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. **Boletim de Pesquisas Florestais Colombo**, n.41, p.18-36, 2000.

SHIVRAIN, K. V.; BURGOS, N. R.; ANDERS, M.M.; RAJGURUA, S.N.; MOORE, J.; SALES, A. M. Gene flow between Clearfield™ rice and red rice. **Science Direct**. 2007.

SPOONER, D.; TREUREN, R.; VICENTE de, M. C. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin nº 10. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy, p. 126, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia do estresse. In: **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Ed. ARTMED, p. 613, 2006.

TESTOLIN, R., HUANG, W.G., LAIN, O., MESSINA, R., VECCHIONE, A., CIPRIANI, G. A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** v.103, n.1, p.30–36, 2001.

The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): 2008 update: International Rice Genome Sequencing Project. **Nucleic Acids Research**. V. 36, 2008.

UNCTAD – UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT. Disponível em: <<http://unctad.org/infocomm/anglais/rice/characteristics.htm>> Acesso em: 06 Dez 2009.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** V. 23, n. 21, p.4407-4414, 1995.

WANG, Z.Y.; TSOI, K.H.; CHU, K.H. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. **Biochemical Systematics and Ecology** n.32, p.399–407, 2004.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** n.18, n.7213-7218, 1990.

WICHAN, E., YONEMORI, K., KANZAKI, S. Amplified fragment length polymorphism analysis for studying genetic relationships among *Mangifera* species in Thailand. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** v.125, n.2, p.160–164, 2000.

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

XU, D.H., WAHYUNI, S., SATO, Y., YAMAGUCHI, M., TSUNEMATSU, H., BAN, T. Genetic diversity and relationships of Japanese Peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing. **Gen. Res. Crop Evol.** v.53, n.5, p. 883–889, 2006.

YU, J.; HU, S.; WANG, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). **Science**, v. 296, p. 79-92, 2002.

ZHAO, L.P.; CHEN, L.; GAO, Q.K. The advancement of gene cloning and genetic transformation and the prospect of EST in functional genomics research of tea plant (*Camellia sinensis*). **Proceedings of Third Tea Industry Symposium**. Taiwan Straits, p. 292–300, 2003.