

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO
DEGRANÉ EM ARROZ

Anderson Luis Nunes
Engenheiro Agrônomo/UTFPR, Mestre/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase Herbologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Janeiro de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Anderson Luis
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES
RELACIONADOS AO DEGRANE EM ARROZ / Anderson Luis
Nunes. -- 2012.
121 f.

Orientador: Aldo Merotto Júnior.
Coorientador: Ribas Antonio Vidal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Debulha natural. 2. Fenotipagem. 3.
Genotipagem. 4. Expressão gênica. 5. Mutação. I.
Merotto Júnior, Aldo, orient. II. Vidal, Ribas
Antonio, coorient. III. Título.

ANDERSON LUIS NUNES
Engenheiro Agrônomo - UTFPR
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 06.01.2012
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 30.01.2012
Por

ALDO MEROTTO JUNIOR
Orientador - PPG Fitotecnia

GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

RIBAS ANTONIO VIDAL
Coorientador - PPG Fitotecnia

CARLA ANDRÉA DELATORRE
PPG Fitotecnia

MARCIA MARIA AUXILIADORA NASCHENVENG PINHEIRO MARGIS
Instituto de Biociências/UFRGS

JOSÉ ALBERTO NOLDIN
EPAGRI - Estação
Experimental de Itajaí/SC

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade
de Agronomia

DEDICO

A minha família

***“Não são as ervas más que afogam a
boa semente, e sim a negligência do
lavrador”***

Confúcio

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Aldo Merotto Junior pela orientação e motivação concedida. Também aos Professores da UFRGS, em especial os Professores do Departamento de Plantas de Lavoura, que tive alguma forma de contato, seja através das aulas ou das conversas de corredor. Ao Professor Ribas A. Vidal pela co-orientação.

À Nory pela companhia e dessa forma ter amenizado as dificuldades presentes no período de realização do Doutorado.

À minha família, por entender minha ausência em muitos momentos desse período.

Aos amigos e colegas do PPG Fitotecnia, em especial ao Augusto Kalsing, Ives C. G. Goulart, Micael Serpa, Clever Varianni, Cibele da Costa, Adriana Figueiró e Juliano Wagner.

À Professora Carla Andrea Delatorre pela ajuda concedida durante as pesquisas.

Aos funcionários da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em especial ao Fábio Berndt, Maria Alice Weber, Karina Pieretti, Marisa Bello e Jonatan Anton.

À Ana Paula Trivilin, Sara Hartke e Professor Marcelo Gravina do Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFRGS pela ajuda na transformação das células competentes.

Ao IRGA, EPAGRI e EMBRAPA pelo fornecimento dos genótipos avaliados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o curso.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO DEGRANE EM ARROZ.¹

Autor: Anderson Luis Nunes
Orientador: Aldo Merotto Jr.
Co-orientador: Ribas Antonio Vidal

RESUMO

O degrane é uma das principais características que tornam o arroz vermelho daninho. A compreensão da regulação do degrane em arroz vermelho permitirá o desenvolvimento de procedimentos de biotecnologia que reduzam os problemas causados por esta planta daninha. O objetivo geral deste trabalho foi determinar a variabilidade e a regulação gênica do degrane de sementes em arroz vermelho. Os objetivos específicos foram i) caracterizar fenotipicamente o degrane das sementes em cultivares de arroz, genótipos de arroz silvestre, e ecótipos de arroz vermelho; ii) caracterizar a expressão dos genes conhecidos relacionados ao degrane em populações contrastantes; iii) analisar a variabilidade nucleotídica de genes relacionados direta e indiretamente ao degrane nestas populações; iv) identificar novas sequências gênicas expressas diferencialmente em ecótipos com diferentes níveis de degrane. Os genótipos avaliados apresentaram elevada variabilidade do degrane que variou de 20 a 270 gf. O gene *qSH1* comumente relacionado com o degrane não possui efeito nos genótipos avaliados. A expressão relativa dos genes *OsCPL1* e *OsXTH8* apresentou uma relação direta com o nível de degrane. Já a expressão relativa do gene *OsCel9D* apresentou uma relação inversa aos níveis de degrane. A variabilidade nucleotídica do gene *Os08g0512400* a 1271 bases *upstream* mostrou que os genótipos com o nucleotídeo T possuem em geral elevado degrane, enquanto que os genótipos com o nucleotídeo A apresentam baixo degrane. Além disso, a variação nucleotídica do exon 5 do gene *Os01g0849100* apresentou dois SNPs, nas posições 2981 e 3057, que estão relacionados ao degrane. A metodologia SSH identificou 154 clones diferencialmente expressos que podem estar relacionados ao degrane em arroz. Destes clones, 61% apresentam funções conhecidas relacionadas ao processamento e armazenamento da informação, sinalização, processos celulares e metabolismo. Além de genes conhecidos como *OsCPL1*, os genes *OsXTH8*, *OsCel9D*, *Os08g0512400* e *Os01g0849100* também estão relacionados ao degrane de sementes em arroz.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (121p.) Janeiro, 2012.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GENES RELATED TO SEED SHATTERING IN RICE ¹

Author: Anderson Luis Nunes
Adviser: Aldo Merotto Jr.
Co-adviser: Ribas Antonio Vidal

ABSTRACT

Seed shattering is one of the main traits that make the red rice a weed. Better understanding of seed shattering regulation in red rice can be used to develop biotechnological procedures to reduce the problems of this weed. The main objective of this study was to determine the variability and genetic regulation of seed shattering in red rice. The specific objectives were i) to characterize the seed shattering in rice cultivars, wild rice and red rice ecotypes; ii) to characterize the expression of known genes related to seed shattering in contrasting rice genotypes; iii) to analyze the nucleotide variability of genes directly and indirectly related to seed shattering in these genotypes, and iv) identify new gene sequences differentially expressed in ecotypes with different levels of seed shattering. The evaluated genotypes presented large variability of seed shattering, which ranged from 20 to 270 gf. The gene *qSH1*, commonly related to seed shattering had no effect on the evaluated genotypes. The expression of the genes *OsCPL1* and *OsXTH8* was directly related with seed shattering. Otherwise, the expression of the gene *OsCel9D* was inversely related with seed shattering. The gene *Os08g0512400* was polymorphic at 1271 bases upstream, where, in general, the genotypes with the T nucleotide had high seed shattering, and with the A nucleotide had low seed shattering. In addition, the exon 5 of the gene *Os01g0849100* presented two SNPs at positions 2981 and 3057, which may be related to seed shattering. The SSH study identified 154 clones genes differentially expressed that may be related to seed shattering. The sequencing and analysis of these clones indicated that 61% of them have known functions related to processing and storage of information, signaling, cellular processes and metabolism. The variability of seed shattering in red rice is related with several genes. In addition to the know gene *OsCPL1*, the genes *OsXTH8*, *OsCel9D*, *Os08g0512400* and *Os01g0849100* are also related to seed shattering in rice.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (121p.) January, 2012.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 O arroz daninho	5
2.2 Aspectos gerais sobre o degrane	8
2.3 Aspectos morfológicos do degrane	11
2.4 Aspectos genéticos e moleculares do degrane.....	14
2.5 Quantificação do degrane em arroz.....	19
2.5.1 Avaliações dos níveis de degrane em arroz.....	19
2.5.2 Técnicas moleculares empregadas na localização de genes relacionados ao degrane.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Fenotipagem do degrane em populações de <i>Oryza</i> spp.....	24
3.2 Expressão de genes relacionados ao degrane e parede celular através de RT-PCR em tempo real.....	26
3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	26
3.2.2 Desenho dos <i>primers</i>	28
3.2.3 Reação de RT-PCR em tempo real.....	29
3.2.4 Análise da reação RT-PCR em tempo real	31
3.3 Genotipagem de populações de <i>Oryza</i> spp. quanto a genes relacionados ao degrane	32
3.3.1 Extração de DNA.....	32
3.3.2 Amplificação das regiões a serem sequenciadas.....	33
3.3.3 Purificação.....	34
3.3.4 Sequenciamento.....	35
3.3.5 Alinhamento	36
3.4 Identificação de genes expressos na zona de abscisão através da técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)	36
3.4.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	37

SUMÁRIO

3.4.2	Digestão dos ds cDNAs com a enzima de restrição <i>Rsa I</i>	39
3.4.3	Ligação de adaptadores	40
3.4.4	Hibridização subtrativa	42
3.4.5	Hibridização subtrativa primária	42
3.4.6	Hibridização subtrativa secundária.....	43
3.4.7	Amplificação supressiva primária	43
3.4.8	Amplificação supressiva secundária.....	44
3.4.9	Ligação dos cDNA-SSH no vetor pGEM [®] -T Vector Systems	44
3.4.10	Transformação dos produtos das reações de ligação.....	45
3.4.11	Análise das colônias transformadas pela PCR	46
3.4.12	Análise da similaridade das sequências.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Fenotipagem dos genótipos de arroz quanto ao degrane através de método quantitativo.....	47
4.2	Expressão de genes relacionados ao degrane e parede celular na junção entre o pedicelo e a flor.....	52
4.2.1	Genes com efeito comprovado sobre o degrane.....	53
4.2.2	Genes relacionados à parede celular	57
4.2.3	Genes com possível ação sobre o degrane	60
4.3	Variabilidade nucleotídica de genes relacionados ao degrane e parede celular	64
4.3.1	Genes com efeito comprovado sobre o degrane.....	64
4.3.2	Genes relacionados à parede celular	69
4.3.3	Genes com possível ação sobre o degrane	71
4.4	Identificação de novos genes relacionados ao degrane através da técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH)	82
4.4.1	Processamento e armazenamento da informação	92
4.4.2	Sinalização e processos celulares.....	95
4.4.3	Metabolismo	95
5	CONCLUSÕES.....	97
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
7	APÊNDICES	107
8	VITA.....	121

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Diferenciação das principais características das subespécies índica, japônica e javânica (Smith & Dilday, 2003).	6
2. Denominação, origem e tipo dos genótipos avaliados nas safras 2008/09 e 2010/11.....	25
3. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para RT-PCR em tempo real, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado	30
4. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para sequenciamento, temperatura de pareamento, posição do <i>primer</i> no gene e tamanho do fragmento esperado	34
5. Sequências dos <i>primers</i> para a síntese de cDNA	37
6. Sequências de adaptadores e primers específicos	40
7. Configuração das reações de ligação dos adaptadores nas amostras tester.....	40
8. Configuração da análise de eficiência da ligação dos adaptadores	41
9. Estratégia de obtenção das subtrações nos sentidos direto e reverso para a análise da expressão gênica diferencial na região pedicelo-flor.....	42
10. Configuração das reações de hibridização subtrativa primária das bibliotecas no sentido direto e reverso	42
11. Análise da similaridade dos clones sequenciados e isolados na técnica de SSH na presença e ausência de degrane.....	83

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Imagens de fluorescência de seções longitudinais entre a junção do pedicelo e a flor de arroz. A) <i>O. nivara</i> com camada de abscisão (al) completa. B) <i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i> com camada de abscisão incompleta. C) <i>O. sativa</i> spp. <i>japonica</i> com camada de abscisão mais incompleta em comparação a <i>O. sativa</i> spp. <i>indica</i> . f = flor; p = pedicelo; v = feixe vascular; al = camada de abscisão. Fonte: Li <i>et al.</i> , 2006b. Com permissão da “The American Association for the Advancement of Science”.....	12
2. Otimização dos ciclos de PCR, com 14, 18, 22 ou 26 ciclos e 1 ou 5 µL de RNA. Amostra A1 = AV 60; Amostra A7 = Lacassine (não utilizado) e Amostra A10 = Batatais.	39
3. Resultado da análise da eficiência da ligação dos adaptadores nas amostras <i>tester</i> em gel de agarose 1%.	41
4. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo no momento da maturação fisiológica das sementes nos ecótipos que apresentaram diferença entre os terços da panícula.	48
5. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo no momento da maturação fisiológica das sementes na média dos três terços das panículas dos genótipos avaliados na safra 2008/09.	49
6. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo no momento da maturação fisiológica das sementes nos genótipos de arroz avaliados na safra 2010/11.	50
7. Resistência à tensão de ruptura do grão no pecíolo. A) dez dias após a polinização; B) no momento da maturação fisiológica das sementes.....	53
8. Curva de amplificação em PCR em tempo real para o controle endógeno 28S rRNA e <i>qSH1</i> conforme ajuste obtido através do programa LinRegPCR.	54
Expressão relativa de genes com relação comprovada sobre o degrane, aos dez dias após a polinização.....	56
9. Expressão relativa de genes relacionado a parede celular, aos dez dias após a polinização.	59
10. Expressão relativa de genes com possível ação sobre o degrane na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização.	63
11. Alinhamento parcial das sequências a aproximadamente 11 kb <i>upstream</i> do gene <i>qSH1</i> em 36 genótipos de arroz. Fita senso.....	66

RELAÇÃO DE FIGURAS

12. Alinhamento parcial das sequências do exon 6 do gene <i>OsCPL1</i> em 36 genótipos de arroz. SNPs 1, 2 e 3. Fita senso.	68
13. Alinhamento parcial das sequências entre o intron sete e o exon 8 do gene <i>OsCPL1</i> em 36 genótipos de arroz. SNP 4. Fita Senso.	69
14. Alinhamento parcial das sequências do intron 1 do gene <i>OsXTH8</i> em 36 genótipos de arroz. Fita senso.	70
15. Alinhamento parcial das sequências do exon 15, do gene <i>Os02g0613200</i> em 36 genótipos de arroz. SNP esperado na posição 6782 da fita anti-senso.	72
16. Alinhamento parcial das sequências do intron 5, do gene <i>Os03g0745400</i> em 36 genótipos de arroz. SNP esperado na posição 3086 da fita senso.	73
17. Alinhamento parcial das sequências do gene <i>Os11g0148700</i> em 36 genótipos de arroz. SNP esperado na posição 6486 da fita reversa.	74
18. Alinhamento parcial das sequências do intron 1, do gene <i>Os05g0117300</i> em 29 genótipos de arroz. SNP esperado na posição 804 da fita senso.	75
19. Alinhamento parcial das sequências a 98 bases <i>upstream</i> do gene <i>Os10g0137700</i> em 28 genótipos de arroz. Fita senso.	76
20. Alinhamento parcial das sequências a 1271 bases <i>upstream</i> do gene <i>Os08g0512400</i> em 31 genótipos de arroz. Fita senso.	78
21. Relação entre o nível da Resistência à retenção de ruptura (RTR) e o nucleotídeo presente a 1271 bases <i>upstream</i> do gene <i>Os08g0512400</i> . T = Timina, A = Adenina, – = informação não disponível.	79
22. Alinhamento parcial das sequências do exon 5 do gene <i>Os01g0849100</i> em 32 genótipos de arroz. Fita reversa.	80
23. Relação entre o nível da Resistência à retenção de ruptura (RTR) e os nucleotídeos presentes nas posições 2981 e 3057 do gene <i>Os01g0849100</i> . T = Timina, A = Adenina, G = Guanina.	81
24. Agrupamento dos clones SSH obtidos na biblioteca “presença de degrane” (PD) em arroz utilizando o programa COGs do NCBI.	89
25. Agrupamento dos clones SSH obtidos na biblioteca “ausência de degrane” (AD) em arroz utilizando o programa COGs do NCBI.	89

RELAÇÃO DE FIGURAS

26. Categorização funcional dos clones SSH obtidos na biblioteca “presença de degrane” (PD) em arroz utilizando o programa COGs do NCBI.....	90
27. Categorização funcional dos clones SSH obtidos na biblioteca “ausência de degrane” (AD) em arroz utilizando o programa COGs do NCBI.....	91

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

μg	Micro grama
μL	Micro litro
μM	Micro molar
A	Adenina
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
CL	Clearfield [®]
cm	Centímetro
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramma
G	Guanina
gf	Gramma força
ha	Hectare
IRGA	Instituto Rio Grandense do Arroz
kb	Kilobase
LN ₂	Nitrogênio líquido
M	Molar
mM	Mili Molar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
<i>OsCel9D</i>	Gene da família 9 das <i>Glycoside hydrolases</i>
<i>OsCPL1</i>	Gene <i>Oryza sativa carboxy-terminal domain phosphatase-like 1</i>
<i>OsXTH8</i>	Gene <i>xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases 8</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pmol	Pico mol
PVP	Polivinilpirrolidona
<i>qSH1</i>	Gene <i>quantitative Shattering 1</i>
QTL	Quantitative trait loci
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa
RTR	Resistência de tensão de ruptura
<i>Sh4</i>	Gene <i>Shattering 4</i>

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

SNP	Single nucleotide polymorphism
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
T	Timina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade

1 INTRODUÇÃO

O arroz cultivado é consumido em todos os continentes, apresenta elevada produção e área de cultivo, e possui elevada importância econômica e social na maioria dos países. O Brasil é o décimo maior produtor mundial de arroz, com cerca de 13,6 milhões de toneladas na safra 2010/2011. No Rio Grande do Sul (RS), este cereal ocupa área superior a 1,1 milhões de hectares, produzindo ao redor de 6,8 milhões de toneladas ao ano. A produtividade média obtida no RS é de 6454 kg ha⁻¹ (Irga, 2010). Nessa região, apesar da produtividade média ter aumentado nos últimos anos, esta se encontra abaixo da produtividade alcançada pelas lavouras que adotam alto nível tecnológico e do potencial obtido nas áreas experimentais. Isso ocorre, dentre outros fatores, devido aos efeitos da interferência resultantes do controle insatisfatório das plantas daninhas.

Entre as espécies daninhas que infestam as lavouras de arroz, destaca-se o arroz vermelho como aquela que mais limita o potencial de produtividade do arroz. As infestações com arroz vermelho comumente são superiores a 10 plantas por m² e chegam em algumas lavouras a 1000 plantas por m². Em média, a presença de uma planta de arroz vermelho m⁻² reduz em 2,1% a produtividade de grãos do arroz cultivado (Balbinot Junior *et al.*, 2003).

Apesar do arroz vermelho e do arroz cultivado pertencerem a mesma espécie botânica, diferenças relacionadas principalmente ao degrane e a dormência fisiológica das sementes são as principais características que tornam o arroz vermelho daninho e que resultam em prejuízos ao arroz cultivado. O degrane impossibilita a colheita das sementes e resulta no aumento do número de sementes no solo. Já a dormência das sementes do arroz vermelho permite a germinação escalonada no tempo, resultando na quase que perpetuação desta planta daninha uma vez estabelecida em uma lavoura. No entanto, a análise de todos os tipos de arroz daninho, como o arroz vermelho e as espécies silvestres, indica que a debulha natural é a característica onipresente, pois existe arroz daninho, especialmente na Ásia e na África, que apresenta baixa dormência, à semelhança da maioria das cultivares modernas (Delouche *et al.*, 2007).

A compreensão da variabilidade do degrane em arroz vermelho poderá ser utilizada para determinar práticas de manejo para reduzir os problemas com esta planta daninha em lavouras de arroz irrigado. O arroz é a planta cultivada mais conhecida em nível genômico. As informações provenientes do sequenciamento de DNA e de outros estudos genéticos e moleculares têm resultado no aumento dos conhecimentos relacionados, por exemplo, a especiação, domesticação, ploidização e adaptação ecológica do gênero *Oryza*. A associação das informações provenientes do sequenciamento de DNA do arroz cultivado com a variabilidade genética de outras espécies ou de ecótipos silvestres do gênero *Oryza* possibilita o entendimento de caracteres que tornam as plantas de arroz vermelho daninhas, como por exemplo, o degrane das sementes.

O degrane sempre foi considerado como uma característica quantitativa, governado por uma série de genes. Entretanto, no ano de 2006 dois trabalhos independentes publicados em revistas de alto impacto mostraram haver um gene principal que governava esta característica em arroz. Nestes trabalhos, estudos de QTL, análises de haplótipos e análises de associação identificaram que o gene *qSH1* na subespécie *O. sativa japonica* (Konishi *et al.*, 2006) e o gene *Sh4* na subespécie *O. sativa indica* (Li *et al.*, 2006b) explicam 69% do degrane. Estes conhecimentos representam uma nova perspectiva com relação à possibilidade do controle do arroz vermelho num futuro em longo prazo, pois, se a característica de interesse é governada por um gene principal, e este for passível de manipulação, seria possível mudar o fenótipo alterando o comportamento do degrane.

Genótipos de arroz vermelho que não apresentam degrane tendem a extinção por não conseguirem repor ao solo as sementes que germinarão ao longo dos anos. Entretanto, não se sabe se o degrane dos genótipos locais de arroz vermelho se comporta da mesma forma que os avaliados nos trabalhos descritos acima. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo geral determinar a variabilidade do degrane das sementes em arroz vermelho; e como objetivos específicos: i) caracterizar fenotipicamente o degrane das sementes em cultivares de arroz, genótipos de arroz silvestre, e ecótipos de arroz vermelho; ii) caracterizar a expressão dos genes conhecidos relacionados ao degrane em populações contrastantes; iii) analisar a variabilidade nucleotídica de genes relacionados direta e indiretamente ao degrane nestas populações; iv) identificar novas sequências gênicas expressas diferencialmente em ecótipos com diferentes níveis de degrane.

O presente estudo teve por hipóteses: i) os genótipos de arroz apresentam variabilidade fenotípica quanto ao degrane das sementes; ii) parte da variabilidade fenotípica do degrane das sementes é devida a variabilidade nucleotídica e a expressão diferencial dos genes relacionados ao degrane; iii) genes relacionados ao degrane que apresentarem modificações não nulas na sua estrutura de nucleotídeos poderão ter seu nível de expressão alterado; iv) genes são expressos de forma diferencial na região entre o pedicelo e a flor em genótipos com presença de degrane em comparação a genótipos com menores níveis de degrane.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O arroz daninho

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma espécie originária do continente asiático (Molina *et al.*, 2011). Tanto o arroz cultivado quanto o arroz daninho evoluíram a partir de espécies silvestres do gênero *Oryza*. Das 22 espécies silvestres do gênero *Oryza*, 9 são tetraplóides (BBCC, CCDD) e o restante é diplóide (Khush, 1997). A diversificação em diferentes grupos do gênero *Oryza* provavelmente ocorreu na China a cerca de 8.000 anos atrás (Molina *et al.*, 2011). As espécies silvestres *O. rufipogon*, *O. nivara*, *O. glumaepatula*, *O. meridionalis*, *O. breviligulata*, *O. longistaminata* e as espécies cultivadas *O. sativa* e *O. glaberrima* pertencem ao *pool* gênico diplóide (AA) e podem hibridizar uma com as outras (Jena, 2010). Ainda não está totalmente elucidado de qual espécie *O. sativa* evoluiu. Acredita-se que *O. sativa* evoluiu a partir das espécies silvestres *O. nivara* e *O. rufipogon* (Smith & Dilday, 2003). O arroz cultivado *O. sativa* desenvolveu três subespécies principais: índica, japônica e javânica. Na Tabela 1 é possível verificar as principais diferenças que as subespécies de *O. sativa* possuem (Smith & Dilday, 2003). A domesticação em diferentes regiões climáticas da Ásia resultou na evolução de dois tipos de arroz japônica (Jena, 2010). O arroz japonico tropical que é

cultivado no sul dos Estados Unidos e o arroz japonico temperado é cultivado no Japão e na Califórnia. No Brasil, o arroz cultivado na maioria das áreas pertence a subespécie índica. A espécie *O. glaberrima* é uma espécie de arroz cultivado com origem no continente africano (Delouche *et al.*, 2007). Esta espécie é considerada daninha nas regiões do mundo onde ela não é cultivada (Smith & Dilday, 2003).

TABELA 1. Diferenciação das principais características das subespécies índica, japônica e javanica (Smith & Dilday, 2003).

Característica	Índica	Japônica	Javanica
Folhas	Verdes claras e longas	Verdes escuras e estreitas	Verdes claras, largas e eretas
Grãos	Delgados	Curtos e arredondados	Compridos e grossos
Perfilhamento	Elevado	Médio	Baixo
Porte	Alto	Médio	Alto com caules grossos
Aristas	Geralmente ausente	Ausente a longa	Ausente a longa
Sensibilidade ao fotoperíodo	Variada	Ausente a Baixa	Baixa
Degrane natural	Fácil	Difícil	Difícil

Das três subespécies de arroz, a subespécie índica é a que possui maior facilidade de degrane (Tabela 1). Nessa subespécie as perdas de rendimento são tão elevadas que a redução dos níveis de degrane é um dos objetivos do melhoramento genético (Delouche *et al.*, 2007). A comparação entre a camada de abscisão das subespécies japônica e índica permite verificar que na subespécie japônica a camada é descontínua e completamente ausente na região dos feixes vasculares. Já na subespécie índica a camada de abscisão é mais proeminente (Li *et al.*, 2006b).

O arroz daninho, especialmente aquele que possui pericarpo vermelho, é bastante conhecido da cadeia produtiva do arroz. O sucesso do arroz vermelho como planta daninha parece estar associado à cor do seu pericarpo

(Sweeney *et al.*, 2006). Entretanto, não há evidências de que a cor do pericarpo *per se* tenha um efeito no hábito daninho dessas plantas. O arroz vermelho é uma planta daninha de sucesso porque possui uma série de características que contribui para que o mesmo seja eficiente na infestação de lavouras e apresente difícil controle. Segundo Delouche *et al.*, (2007) algumas dessas características são compartilhadas com outras espécies daninhas problemáticas, como por exemplo:

- Adaptação facilitada a práticas agronômicas;
- Ciclo de desenvolvimento sincronizado com o ciclo da cultura;
- Emergência rápida e vigorosa;
- Sementes de arroz vermelho podem ser facilmente distribuídas através das sementes de arroz cultivado;
- Intensa e prolongada dormência das sementes que mantém a viabilidade das sementes que caíram no solo através do degrane;
- Elevados níveis de degrane que permitem que a elevada produção de sementes seja dispersa nos sistemas de produção agrícola e aumente o número de sementes de arroz vermelho no solo cultivado.

Entretanto, há também características únicas do arroz daninho em relação a outras espécies daninhas, devido à semelhança botânica entre o arroz daninho e o cultivado. Estas características contribuem ainda mais na complexidade e dificuldade de controle do arroz daninho em lavouras de arroz (Delouche *et al.*, 2007). A maioria dos ecótipos de arroz daninho são fenotípica e morfológicamente semelhantes ao arroz cultivado desde a plântula até a fase reprodutiva da planta. Esta semelhança dificulta a identificação do arroz

daninho no momento de controle de plantas daninhas na cultura do arroz. Além disso, a semelhança das sementes dificulta a separação das sementes de arroz daninho em relação às sementes de arroz cultivado (Smith & Dilday, 2003). Outro grande problema é que devido às semelhanças bioquímicas e fisiológicas entre o arroz vermelho e o cultivado, a estratégia de controle utilizando herbicidas seletivos, que é uma importante forma de controle de outras plantas daninhas, não possui eficiência no controle de arroz daninho (Balbinot Junior *et al.*, 2003). Assim, para promover o controle químico do arroz vermelho foram desenvolvidas plantas de arroz cultivado tolerantes aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas, através de mutação induzida. Apesar de representar um grande avanço tecnológico para a cultura do arroz, essa estratégia apresenta limitações, principalmente relacionadas à ocorrência de fluxo gênico para o arroz vermelho e a geração de biótipos de arroz vermelho resistente as imidazolinonas (Shivrain *et al.*, 2007). Cada uma das características citadas acima contribuiu para a complexidade do problema relacionado ao arroz vermelho na cultura do arroz. Entretanto, a característica relacionada ao degrane das sementes possui elevada importância e complexidade para a co-evolução do arroz vermelho em conjunto com o arroz cultivado, e pode representar potencialidades para o desenvolvimento de ferramentas que contribuam para o controle de arroz daninho.

2.2 Aspectos gerais sobre o degrane

O degrane ou debulha natural é uma característica evolutiva e adaptativa para a dispersão e distribuição de sementes em espécies silvestres

do arroz (Li *et al.*, 2006b; Lin *et al.*, 2007). No entanto, esta característica pode causar perdas consideráveis no rendimento de grãos do arroz domesticado. Através do processo de domesticação foram selecionados biótipos com baixos níveis de degrane (Gu *et al.*, 2005). Atualmente, na cultura do arroz o grau de debulha considerado desejável em uma cultivar depende da forma de colheita. Na colheita mecanizada, o processo é mais eficiente nas cultivares que apresentam um pequeno grau de debulha em relação àquelas que não apresentam debulha natural (Kobayashi, 1990). Nas situações onde a colheita é realizada manualmente é desejável que as cultivares não tenham qualquer nível de degrane para evitar perdas nos processos de corte e transporte das plantas.

As plantas cultivadas não possuem desvantagem por não possuírem degrane acentuado, uma vez que a sua sobrevivência é dependente das atividades humanas. Já no arroz silvestre, e daninho, a ausência de degrane seria desvantajosa para as plantas que crescem associadas às plantas cultivadas (Gu *et al.*, 2005). Com a ausência de debulha natural, a maioria das sementes produzidas pelas espécies silvestres e daninhas seria colhida e retirada do local de infestação, diminuindo continuamente sua densidade populacional. Este processo resultaria no desaparecimento da espécie daninha, uma vez que o acréscimo no banco de sementes ocorre principalmente através do degrane das sementes das plantas estabelecidas no local durante o ciclo da cultura anterior (Avila *et al.*, 2000). O caráter degrane das sementes contribui na dispersão e distribuição do arroz vermelho. O degrane permite que parte das sementes produzidas seja distribuída sobre a superfície do solo antes e durante a colheita, evitando que as sementes sejam

colhidas com a cultura e removidas do sistema de produção (Delouche *et al.*, 2007).

Os ecótipos de arroz vermelho tendem a apresentar pouca variabilidade quanto à intensidade do degrane. As sementes de ecótipos que apresentam baixo degrane acabam sendo eliminadas da lavoura juntamente com grãos da cultura (Delouche *et al.*, 2007), e, possivelmente, serão separados durante o processo de beneficiamento das sementes para o próximo plantio. Do mesmo modo, ecótipos com elevado degrane fazem com que sua erradicação seja dificultada, pois esta característica consiste em um dos principais meios de disseminação das sementes, causando reinfestação do banco de sementes.

Nos Estados Unidos, dentre 19 ecótipos de arroz vermelho provenientes de quatro estados, dez ecótipos apresentaram níveis de degrane de moderadamente elevado a elevado, com início do degrane ocorrendo entre 11 e 18 dias após a antese (Noldin *et al.*, 1999). Neste estudo, três ecótipos apresentaram níveis de degrane muito baixo, semelhantes aos níveis de três cultivares de arroz branco. No Sul do Brasil, ecótipos de arroz vermelho provenientes de lavouras de arroz irrigado também foram pouco variáveis em relação ao degrane das suas sementes na fase da maturação (Schwanke *et al.*, 2008). Dos 16 ecótipos avaliados, 11 apresentaram fácil degrane, quatro foram de degrane intermediário e apenas um ecótipo apresentou difícil degrane. Nesta mesma avaliação as cultivares BR-IRGA 409 e 410 e El Paso L 144 foram classificados como de degrane intermediário, e IRGA 417 de difícil degrane (Schwanke *et al.*, 2008). Através deste trabalho ficou evidente que a maioria dos ecótipos de arroz vermelho utilizam o degrane como uma das principais formas de dispersão das sementes e perpetuação da espécie.

2.3 Aspectos morfológicos do degrane

Normalmente a zona de abscisão entre o grão do arroz e o pedicelo é formada por uma camada de pequenas células com a parede celular fina. A zona de abscisão geralmente compreende uma única camada de células especializadas posicionalmente e funcionalmente diferenciadas (Roberts *et al.*, 2002). Essas células têm sido caracterizadas pelo crescimento celular elevado em resposta ao etileno e auxina (Osborne & Morgan, 1989). Imagens de fluorescência de seções longitudinais entre a junção do pedicelo e a flor de arroz mostram a zona de abscisão (Figura 1) (Li *et al.*, 2006b). Nas plantas que apresentam elevado degrane, como na espécie silvestre *O. nivara*, a camada de células é contínua em toda a zona de abscisão (Figura 1A). A subespécie índica que possui menores níveis de degrane em comparação a *O. nivara* possui a camada de abscisão incompleta (Figura 1B). Já nas plantas que possuem pouca debulha natural, como a subespécie japonesa, esta camada é descontínua e completamente ausente na região dos feixes vasculares (Figura 1C).

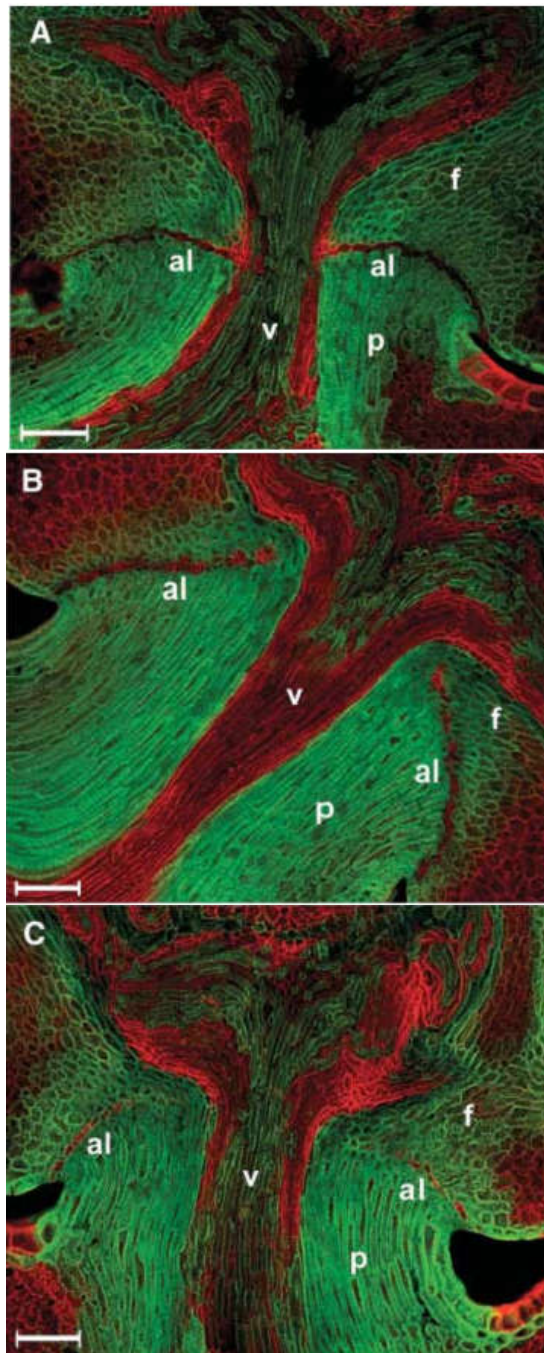


FIGURA 1. Imagens de fluorescência de seções longitudinais entre a junção do pedicelo e a flor de arroz. A) *O. nivara* com camada de abscisão (al) completa. B) *O. sativa* spp. *indica* com camada de abscisão incompleta. C) *O. sativa* spp. *japonica* com camada de abscisão mais incompleta em comparação a *O. sativa* spp. *indica*. f = flor; p = pedicelo; v = feixe vascular; al = camada de abscisão. Fonte: Li *et al.*, 2006b. Com permissão da “The American Association for the Advancement of Science”.

A debulha natural do grão de arroz é causada pela diferenciação da camada de abscisão que delimita o grão do pedicelo. O processo de abscisão é gerado pela produção de etileno, que inibe a produção de auxina. Respondendo a certos sinais, enzimas hidrolíticas, como poligalacturonase e β -endo-glucanase, são produzidas nas células da camada de abscisão, causando a degradação da lamela média e da parede celular resultando na queda do grão (Roberts *et al.*, 2000; Patterson, 2001; Roberts *et al.*, 2002). A expressão de beta-1,4-glucanase no feijoeiro aumentou durante o processo de abscisão das sementes promovido por etileno, mas foi reprimida em função da aplicação de auxina (Tucker *et al.*, 1988). No tomateiro um conjunto de genes codificando celulases foi clonado (*Cel1* a *Cel7*), e a redução na expressão destes genes levou ao aumento da força necessária para o destacamento do fruto (Taylor *et al.*, 1994).

Avanços na identificação de genes que são expressos durante o processo de separação de células destacam duas classes principais (Roberts *et al.*, 2000). Uma classe está envolvida no mecanismo de separação célula a célula, enquanto a segunda é composta por genes que são propensos a proteção celular. A expressão destes genes de proteção pode ser localizada tanto nas células da zona de abscisão que se separam da planta mãe quanto nas células que permanecem (Mao *et al.*, 2000). Estas proteínas protegem do ataque microbiano a parte exposta da planta no momento do degrane. Na maturação de frutos de muitas espécies, uma vez que o afrouxamento da parede celular é iniciado, uma camada de proteção anatomicamente distinta aparece próximo ao local de separação. A camada de proteção pode

originar-se a partir da deposição de suberina ou lignina nas células recém-expostas da camada de separação (Mao *et al.*, 2000).

O nível de degrane em uma planta também é determinado pelo momento em que a diferenciação da camada de abscisão ocorre. A avaliação da camada de abscisão de biótipos de arroz vermelho dos Estados Unidos mostrou que o padrão de formação e degradação da camada de abscisão era diferente em comparação ao arroz silvestre *O. rufipogon* e o arroz cultivado (Thurber *et al.*, 2011). No arroz vermelho, antes da floração a camada de abscisão estava formada e na floração o processo de degradação desta camada já havia iniciado. Já no arroz silvestre a camada de abscisão não apresentou degradação até que a floração tivesse ocorrido (Thurber *et al.*, 2011). Dessa forma, a diferenciação precoce da camada de abscisão é fundamental para os genótipos que apresentam elevados níveis de degrane.

2.4 Aspectos genéticos e moleculares do degrane

Vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar genes envolvidos no degrane em arroz, principalmente em arroz cultivado. Análises genéticas de uma população F₂ proveniente do cruzamento entre *Oryza sativa* ssp. *indica* e *O. nivara* (espécie silvestre e anual) identificaram três QTLs (*Sh3*, *Sh4* e *Sh8*) responsáveis pela redução da debulha natural de grãos no arroz cultivado (Li *et al.*, 2006a). Neste estudo, verificou-se que o QTL *Sh4* localizado no cromossomo 4 é dominante e explica 69% da variância fenotípica. Já os QTLs *sh3* e *sh8* explicam apenas 6,0 e 3,1%, respectivamente. Da mesma forma, análises genéticas realizadas entre *O. sativa* ssp. *japonica* com três espécies silvestres (*O. rufipogon*, *O. glumaepatula* e *O. meridionalis*)

verificaram que um alelo de grande efeito e dominante também presente no cromossomo 4 das três espécies é responsável pelo deigrane (Sobrizal *et al.*, 1999; Nagai *et al.*, 2002). Entretanto, analisando uma população F₂ oriunda do cruzamento entre *O. sativa* spp. *indica* e *O. sativa* spp. *japonica* detectou-se cinco QTLs, sendo que, o alelo *qSH1* presente no cromossomo 1 explicou 69% da variância fenotípica (Konishi *et al.*, 2006).

O gene *Sh4* (sinônimo *SHA1*) está localizado entre os marcadores RC4-123 e RM280 (Li *et al.*, 2006a) que possuem uma distância física de cerca de 1360 kb no cromossomo 4 do genoma do arroz (Feng *et al.*, 2002). Examinando este gene, foi verificado que uma mutação (substituição do nucleotídeo G por T, resultando na substituição do aminoácido asparagina por lisina) em uma região de 1,7 kb é responsável pela origem da ausência de debulha no arroz cultivado. (Li *et al.*, 2006b). O gene com essa mutação que até então não tinha sua função conhecida é provavelmente um fator de transcrição localizado na sequência LOC_Os04 g57530 (TIGR Rice Genome Annotation Database). Para confirmar a função do gene *Sh4* foram realizadas transformações em arroz onde as duas construções geradas diferenciavam apenas na mutação por substituição do nucleotídeo G por T. A expressão do gene nas construções foi determinada por RT-PCR em tempo real na qual foi verificada que nas plantas com o gene mutado a força necessária para a retirada do grão do pedicelo era maior em comparação ao controle (Li *et al.*, 2006b). Estes resultados indicam que o gene *Sh4* possui uma importante função na formação da camada de abscisão e/ou que este gene pode estar envolvido na ativação do processo de abscisão.

O gene *qSH1* está localizado entre o marcador C434 no cromossomo 1 (Konishi *et al.*, 2006). Este gene codifica um gene *homeobox* tipo BEL-1, e um SNP na região regulatória 5' causa a perda da expressão do gene *qSH1* somente na camada de abscisão. A substituição do nucleotídeo G por T, na posição 11841 bases *upstream* ao gene *qSH1* é responsável pela origem da ausência de debulha no arroz cultivado (Konishi *et al.*, 2006). Para confirmar a função do gene *qSH1* foram realizadas transformações em arroz onde somente as linhagens transgênicas contendo tanto o SNP quanto o gene *qSH1* apresentaram degrane (Konishi *et al.*, 2006). Isso mostra que o gene *qSH1* e o SNP na região regulatória 5' são necessários para a ocorrência da debulha natural. Entretanto, a seleção deste gene em genótipos de arroz parece estar relacionada somente à subespécie japônica (Akasaka *et al.*, 2011), pois outros trabalhos têm demonstrado que o gene *qSH1* possui pouco efeito sobre o fenótipo da subespécie Índica (Zhang *et al.*, 2009; Thurber *et al.*, 2010).

O terceiro gene com relação comprovada sobre o degrane é o *OsCPL1* (Ji *et al.*, 2010). Este gene é recessivo, diferentemente dos genes *Sh4* e *qSH1* que são dominantes. O gene foi localizado entre os marcadores RM7161 e RM8262 no cromossomo sete em uma linhagem mutante de arroz derivada de uma cultivar da subespécie japônica que não possui degrane (Ji *et al.*, 2006). Um SNP (G para T) localizado no exon oito do gene *OsCPL1* (LOC_Os07g10690) muda o aminoácido serina para isoleucina no domínio *carboxy-terminal phosphatase* da proteína fazendo com que a mesma perca a função fosfatase e o fenótipo presente degrane (Ji *et al.*, 2010). Linhagens transgênicas com o gene *OsCPL1* inativado por RNA de interferência apresentaram níveis elevados de degrane (Ji *et al.*, 2010). Estes resultados

demonstram que o gene *OsCPL1* reprime a diferenciação da camada de abscisão durante o desenvolvimento da panícula.

Genes potencialmente relacionados ao degrane foram determinados através da técnica de mapa de haplótipos (Huang *et al.*, 2010). Neste trabalho foram fenotipados e sequenciados os genomas de 517 genótipos de arroz da China, sendo 373 genótipos da subespécie indica. Usando uma série de métodos estatísticos, a associação do genoma destes genótipos com a fenotipagem do degrane mostrou haver sete possíveis genes relacionados ao degrane distribuídos nos cromossomos dois, três, cinco, oito, dez, onze e doze (Huang *et al.*, 2010).

Avanços recentes na caracterização do degrane, principalmente, nos aspectos genéticos e moleculares, pode ser utilizada para aprofundar o conhecimento sobre esta importante característica para a dinâmica do arroz vermelho, e dessa forma gerar conhecimento mais específico para o manejo desta planta daninha em lavouras de arroz. O melhor conhecimento sobre o degrane pode ajudar a mitigar uma das principais preocupações com relação ao uso de cultivares transgênicas resistentes a herbicidas. A possibilidade da ocorrência da introgressão genética, onde o gene inserido é transmitido para o genoma de populações daninhas, pode inviabilizar o evento transgênico (Gealy *et al.*, 2003). O uso de cultivares de arroz resistente aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas mostrou que o fluxo gênico para o arroz daninho ocorre de forma rápida, inviabilizando o uso da tecnologia em algumas áreas (Gressel & Valverde, 2009). Isso torna a ocorrência da introgressão genética indesejada, uma vez que haverá seleção positiva, que dificulta o controle de plantas daninhas, porque o gene introgridido traz vantagens adaptativas

devido à resistência aos herbicidas. A dissolução dos efeitos não desejados da introgressão terá maior eficiência se as plantas daninhas introgridas tenham dificuldades adaptativas, ou seja, seleção negativa. A grande questão é como fazer com que a introgressão genética passe do status de indesejada para desejada.

O modelo de genes em série pode ser utilizado na transformação genética de cultivares de arroz, onde se inserem dois genes na planta, o gene de interesse mais o gene mitigante (Al-Ahmad *et al.*, 2004). O gene mitigante deve possuir efeito positivo ou neutro na planta cultivada e efeito negativo na planta daninha (Al-Ahmad *et al.*, 2006). Dessa forma, a característica ausência de degrane poderia ser utilizada (Gressel & Valverde, 2009), pois nas plantas cultivadas esta característica é necessária, e no arroz vermelho é indesejada devido à impossibilidade de dispersão e aumento do número de sementes de arroz vermelho no solo. Assim, a supressão do degrane em arroz vermelho levaria a mitigação do problema relacionado ao fluxo gênico de transgenes, e a um maior controle do arroz vermelho devido à menor perpetuação da planta daninha. Ainda, no desenvolvimento de cultivares de arroz também é realizado seleção de genótipos com baixo degrane. Atualmente, esta seleção é realizada de forma fenotípica e em algumas situações se caracteriza como de grande dificuldade para a obtenção de cultivares com baixo degrane. Existe grande quantidade de estudos sobre o degrane em arroz cultivado. Entretanto, existe necessidade da melhor compreensão da regulação genética do degrane em arroz para que este processo seja entendido, e para que possa ocorrer o desenvolvimento de procedimentos que venham contribuir para a facilitação da seleção do degrane em arroz cultivado e da diminuição da infestação do arroz

vermelho. Para isto, existe a necessidade da quantificação fenotípica do degrane e vários procedimentos moleculares relacionados à variabilidade nucleotídica e de expressão gênica as quais são ferramentas importantes para aprofundar ainda mais o conhecimento molecular sobre o degrane em arroz.

2.5 Quantificação do degrane em arroz

2.5.1 Avaliações dos níveis de degrane em arroz

A determinação dos níveis de degrane em arroz pode ser realizada de forma qualitativa ou quantitativa. A forma qualitativa mais utilizada é aquela na qual o avaliador faz uma pequena pressão com a palma e os dedos da mão sobre a panícula e verifica a quantidade de sementes que se desprenderam da planta. Geralmente as notas para o nível de degrane avaliado dessa forma seguem a escala de avaliações do International Rice Research Institute (Irri, 1980), em que o valor 1 representa difícil degrane (pouco ou nenhum grão desprendido), 5 é intermediário (25 – 50% de grãos desprendido) e 9 de fácil degrane (mais de 50% de grãos desprendido). Determinações do nível de degrane através desta técnica tem sido realizadas no Brasil (Schwanke *et al.*, 2008), China (Huang *et al.*, 2010) e Estados Unidos (Delouche *et al.*, 2007). A principal vantagem desta técnica de determinação do nível de degrane é a rapidez da avaliação em relação aos métodos quantitativos. Entretanto, o avaliador necessita de muita experiência para aplicar sempre a mesma pressão na panícula. Esta técnica apresenta baixa reprodutibilidade, pois outro avaliador não conseguiria realizar o mesmo nível de pressão em outra avaliação. Dessa forma é com pouca segurança que poderíamos comparar os

níveis de degrane entre diferentes estudos quando a determinação é realizada de forma qualitativa.

A determinação do degrane de forma quantitativa é calculada através da resistência à tensão de ruptura (RTR). A RTR é determinada através da geração de uma força crescente no grão até que ocorra o rompimento da camada de abscisão, sendo o resultado expresso em gramas força (gf). Assim, quanto maior a resistência da camada de abscisão à tensão de ruptura exercida pela força aplicada menor é o nível de degrane. O sentido da força exercida para a determinação do degrane pode ser no sentido vertical ou transversal em relação ao eixo pedicelo-grão. A maneira como a força é exercida pode ser realizada de diferentes tipos. Uma forma simples e barata é envolver o grão com um arame e adicionar a estes pesos de massa conhecida até que ocorra a abscisão do grão. Quanto menor a massa dos pesos adicionados maior será a precisão da determinação. Outra forma é utilizar dinamômetros digitais de precisão, que registram a força necessária para o destacamento do grão. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso na determinação do degrane de forma quantitativa em avaliação de ecótipos de arroz do Japão (Konishi *et al.*, 2006) e Estados Unidos (Li *et al.*, 2006b).

2.5.2 Técnicas moleculares empregadas na localização de genes relacionados ao degrane

2.5.2.1 Loci de caracteres quantitativos (QTL)

Os QTLs (*Quantitative Trait Loci*) são regiões cromossômicas relacionadas com a variação fenotípica de uma determinada característica

quantitativa. Eles têm sido identificados através de associações estatísticas significativas entre os valores genotípicos e a variabilidade do caráter de interesse na progênie segregante (Ansari-Mahyari *et al.*, 2009). Em espécies de interesse econômico o principal objetivo dos projetos de mapeamento é a localização de genes envolvidos com a variação genética em fenótipos economicamente importantes, que possam ser diagnosticados diretamente, ou por meio de marcadores genômicos (Mi *et al.*, 2010).

Entre os muitos fatores que influenciam o mapeamento experimental de QTL estão a espécie utilizada, o objetivo do estudo e, principalmente, a população disponível. As diferenças nas estruturas de populações, causadas pelo nível de homozigosidade, frequências genotípicas, e desequilíbrio de ligação também afetam no mapeamento do QTL (Zhao *et al.*, 2007a). O tamanho da amostra requerido para detectar o QTL depende da herdabilidade total do mesmo, da possível interação entre múltiplos QTLs e também do método estatístico empregado na análise de mapeamento. A detecção de QTLs necessita de uma coleção de dados sobre a característica de interesse, o conhecimento sobre o genótipo dessa população e por fim uma análise estatística correlacionando os dados fenotípicos e genotípicos que reflita a organização e estrutura da população (Camp & Cox, 2002). A identificação do QTL pode ser realizada por meio de uma varredura do genoma em que a segregação de um grande número de marcadores, distribuído sobre o genoma inteiro, é testado para associações com o fenótipo observado. Usando cruzamentos entre *O. sativa* spp. *indica* e *O. rufipogon* (espécie silvestre e perene) detectou-se quatro (Cai & Morishima, 2000) e cinco (Xiong *et al.*, 1999; Konishi *et al.*, 2006) QTLs associados ao deigrane.

2.5.2.2 Expressão gênica diferencial através da técnica de hibridização subtrativa supressiva

A identificação do conjunto de genes diferencialmente expressos por uma célula, tecido ou organismo, numa determinada condição em relação à outra com a qual se deseja comparar, permite a compreensão dos fatores necessários para a manifestação do fenótipo (Hillmann *et al.*, 2009). A técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH do inglês *Suppression Subtractive Hybridization*) tem sido utilizada com sucesso para identificar e clonar genes diferencialmente expressos dentro da expressão gênica global da planta ou tecido (Clontech, 2008.).

A técnica de SSH de cDNAs oferece um método para amplificar seletivamente genes expressos diferencialmente em duas populações de mRNAs. A subtração de sequências híbridas entre as duas populações de cDNAs ocorre através da supressão de ampliações indesejáveis, pela separação física de cDNAs de fita simples e cDNAs de fita dupla (Rebrikov *et al.*, 2004). A técnica de SSH combina PCR supressiva com as etapas de normalização e subtração (Diatchenko *et al.*, 1996). Ela consiste na síntese de um cDNA a partir de duas amostras de tecidos ou células contrastantes. O cDNA que se quer analisar é denominado cDNA *tester* (alvo) e o controle é o cDNA *driver*. Os cDNAs *tester* e *driver* são digeridos com uma enzima de restrição. A técnica consiste de duas hibridizações visando o enriquecimento de sequências expressas diferentemente. Em seguida, os cDNAs expressos diferencialmente são amplificados por PCR. Dois ciclos de amplificação também são utilizados a fim de reduzir o produto de ampliações

inespecíficas. O próximo passo é a clonagem de cDNAs para identificar os mRNAs através de sequenciamento e validar a expressão diferencial através de técnicas que determinem a expressão gênica (Diatchenko *et al.*, 1996). Entre as vantagens da técnica de SSH incluem-se a detecção de genes diferencialmente expressos pouco abundantes, a supressão da amplificação de genes altamente expressos, e a identificação de genes sem conhecimento prévio de suas sequências (Rebrikov *et al.*, 2004). As principais desvantagens da técnica são que os resultados dependem da eficácia da ligação dos adaptadores e que somente duas amostras podem ser comparadas em uma mesma biblioteca (Huang *et al.*, 2007).

A técnica SSH foi usada com sucesso na detecção de genes relacionados ao excesso de Al no solo na espécie silvestre de arroz *Oryza rufipogon* (Cao *et al.*, 2011). Além disso, esta técnica foi utilizada com sucesso para descobrir genes envolvidos no processo de desenvolvimento de fibras em *Bambusa balcooa* (Rai *et al.*, 2011). Para isso os autores utilizaram o cDNA isolados a partir da folha como *driver* e o cDNA isolados dos internódios como *tester*. A construção da biblioteca de hibridização subtrativa nos sentidos direto e reverso possibilitou identificar genes promissores sobre a presença e ausência de degrane. Análises mais detalhadas destes genes poderão ser realizadas na tentativa de comprovar sua função.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fenotipagem do degrane em populações de *Oryza* spp.

A primeira fase do trabalho constou da quantificação do degrane em 18 cultivares de arroz, 16 ecótipos de arroz vermelho e duas espécies silvestres (Tabela 2). A semeadura foi realizada em tanques de concreto, contendo solo hidromórfico classificado como gleissolo, localizados no Laboratório da Flora Ruderal (LAFLOR) da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre, RS. A dimensão dos tanques é de 1,20 x 1,10 x 0,80. O solo foi adubado com 40, 45 e 40 kg ha⁻¹ de N, P₂O₅ e K₂O, respectivamente. A semeadura foi realizada com sementes pré-germinadas em linhas de 1,0 m de comprimento, com espaçamento entre linha de 25 cm, e, com densidade de 50 sementes por metro linear. O nível de água acima da superfície do solo foi de 6 cm, o qual foi mantido através de sistema de bóias. A adubação de cobertura foi de 40 kg ha⁻¹ de N no início da diferencial do primórdio floral. O controle de doenças e pragas foi realizado com o fungicida azoxystrobin e o inseticida malationa, nas doses de 100 e 500 g i.a ha⁻¹, respectivamente.

O experimento foi conduzido nas safras 2008/09 e 2010/11, onde a semeadura foi realizada nas datas de 20/11/2008 e 12/11/2010, respectivamente. Cada experimento foi conduzido em delineamento

completamente casualizado com 4 repetições. O nível de degrane foi avaliado em quatro panículas por população quando do início da maturação de cada população. Foi considerada planta madura a que apresentava visualmente mais de dois terços de suas panículas totalmente dobradas e as sementes resistentes à pressão da unha.

TABELA 2. Denominação, origem e tipo dos genótipos avaliados nas safras 2008/09 e 2010/11

Acesso	Tipo	Espécie	Origem	Fornecedor
AV 60	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 172	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 04B	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 53	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 223	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 04A	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 133	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 73	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 109	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 98	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 144	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 182	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 31	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
ITJ 01	daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	EPAGRI
ITJ 03	daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	EPAGRI
ITJ 11	daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Cypress	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
BlueBelle	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Wells	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>japonica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Lacassine	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
CICA 8	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Epagri 109	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Fanny	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
EEL 23	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
EEL 31	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Kaybonnet	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
EMPASC 100	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Batatais	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Nipponbare	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>japonica</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Glaberrima	silvestre/cultivado	<i>O. glaberrima</i>	RS/Brasil	UFRGS
Glumaepatula	silvestre	<i>O. glumaepatula</i>	AM/Brasil	EMBRAPA
IRGA 417	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	RS/Brasil	IRGA
IRGA 422 CL	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	RS/Brasil	IRGA
IRGA 424	Cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	RS/Brasil	IRGA
Puitá INTA CL	Cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	RS/Brasil	IRGA
Sator CL	Cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>Indica</i>	RS/Brasil	IRGA

O nível de degrane foi realizado através da determinação quantitativa da “Resistência à Tensão de Ruptura” (RTR). Na safra 2008/09 esta avaliação foi

realizada nos terços superior, mediano e inferior da panícula. No experimento de 2010/11 a determinação quantitativa da RTR foi determinada em toda a panícula. A RTR foi determinada por meio de pesos com massa de 10 gramas que eram inseridos em um gancho que envolvia o grão de arroz até o desprendimento deste do pedicelo. Dessa forma, quanto maior for o valor da RTR menor será o nível de degrane do grão. O sentido da força exercida pelos pesos foi longitudinal em relação ao pedicelo e ao grão.

Os dados foram analisados através da análise da variância. A expressão dos resultados foi realizada de forma gráfica através da média e do desvio padrão de cada genótipo avaliado. Os gráficos foram gerados pelo programa Sigmaplot (versão 11).

3.2 Expressão de genes relacionados ao degrane e parede celular através de RT-PCR em tempo real

Com base no trabalho anterior foram escolhidos quatro genótipos com níveis contrastantes de degrane dos grãos para avaliação dos níveis de expressão de genes relacionados ao degrane e a parede celular. A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica RT-PCR em tempo real. Os genótipos de alto degrane escolhidos foram os ecótipos de arroz vermelho AV 31 e AV 60, e de baixo degrane as cultivares Lacassine e Batatais.

3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Os ecótipos e cultivares de arroz avaliados foram semeados na safra 2009/10 nas mesmas condições descritas no item 3.1. As panículas selecionadas foram marcadas no dia da polinização natural com pequenas

placas de poliestireno. Perfilhos com panículas polinizadas naturalmente no mesmo dia e hora foram coletadas no mesmo momento aos dez dias após a polinização e conduzidas para o laboratório. Após, foram coletadas 30 junções pedicelo-flor do terço médio da panícula (30 mg de material vegetal) por repetição. O material foi imediatamente depositado em nitrogênio líquido (LN₂). O material coletado consistiu de aproximadamente 1 mm da região do pedicelo e de 1,5 mm da região da flor. A definição desta região foi determinada em função de trabalhos da literatura que determinaram a expressão de genes na zona de abscisão (Ji *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006b). Cada ecótipo ou cultivar contou com três repetições biológicas e cada repetição biológica contou com quatro replicatas.

A extração do RNA foi realizada pelo método Trizol[®]. Inicialmente, o material vegetal foi macerado em LN₂, e imediatamente após foi adicionado 300 µL do reagente Trizol[®] (Invitrogen) para evitar o processo de degradação do RNA. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e incubado durante 5 min em temperatura ambiente. Após, 60 µL de clorofórmio foram adicionados a cada tubo e esses agitados vigorosamente no vortex durante 15 seg. Em seguida os tubos foram incubados em temperatura ambiente durante 5 min e centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. A fase aquosa resultante da centrifugação foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Após foi adicionado solução precipitadora de RNA (0,8 M citrato de sódio e 1,2 M NaCl) e isopropanol gelado na quantidade correspondente a metade do volume da fase aquosa transferida para o novo tubo. Posteriormente os tubos foram invertidos

gentilmente para misturar a solução, incubados durante 10 min em temperatura ambiente e centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante oriundo do processo de centrifugação foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, agitado brevemente e centrifugado a 8000 rpm durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco durante 10 min em estufa com circulação de ar seco a 30°C. Ao fim o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase, incubado durante 10 min a 60°C, centrifugado a 8000 rpm durante 5 min a 4°C para peletizar material insolúvel e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

O RNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro Genesys 2[®], (Thermo Spectronic), em comprimento de onda de 260 nm e diluído a 1 µg µL⁻¹. Uma quantidade de 3 µg de RNA total de cada tratamento foi tratada com DNase[®] I (Invitrogen) conforme a recomendação do fabricante. Posteriormente foi realizada a obtenção de cDNA a partir da formação da fita complementar com a transcriptase reversa SuperScript[®] III (Invitrogen) em quantidade de 3 µg de RNA utilizando iniciadores polidT.

3.2.2 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram obtidos com auxílio do programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). Os critérios de seleção da sequência nucleotídica do *primer* basearam-se na temperatura de pareamento de 60°C, sequência de 20 pb e com 50 a 60% das bases nitrogenadas guanina e citosina. As sequências nucleotídicas dos genes foram obtidas do *genebank* e selecionaram-se regiões dos exons para pareamento dos *primers*. Para garantir a presença de cópia única nas reações de PCR, os *primers* foram

testados utilizando o recurso *Primer-Blast* do NCBI. Na Tabela 3 encontram-se as sequências dos *primers* utilizados, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado.

3.2.3 Reação de RT-PCR em tempo real

As amostras de cDNA foram diluídas na proporção de 1:100 (cDNA: água destilada) e então conduzidas as amplificações. Para a realização da amplificação pela RT-PCR em tempo real foi utilizado o equipamento *7300 Real-Time PCR System*[®] (Applied Biosystems) em placas contendo 96 poços *PCR-96M2 – HS – C*[®] (Axygen) com selador *MicroAmp*[®] *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems). Cada placa foi montada para dois *primers* (Tabela 3) e todas continham amostras de cDNA em quadriplicatas e controle positivo e negativo por *primer*. O controle positivo para a presença de DNA consistiu na presença do *primer* 28S rRNA que possui expressão endógena e o controle negativo consistiu na substituição do DNA por água. O controle endógeno foi realizado através da expressão do gene 28S rRNA.

As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, formado por 10 µL da amostra de cDNA (diluída 1:100) em água MiliQ e 10 µL dos constituintes da reação composta de 2 µL tampão 10X, 0,5 µL dNTPs (10 µM cada nucleotídeo), 1,2 µL de solução de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de SYBR Green[®] (Invitrogen) diluído 1:100 (preparado no momento da utilização a partir de solução diluída 100X), 0,2 µL de ROX Reference Dye, 0,1 µL Taq Platinum[®] (Invitrogen) e 0,4 µL da combinação de *primers forward* e *reverse*.

TABELA 3. Sequências dos *primers* utilizados para RT-PCR em tempo real, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado

Gene	Primer	Sequência (5'→3')	Tm ¹	Origem da sequência	Fragmento esperado (pb)
Genes com ação comprovada sobre o degrane					
qSH1	RT2SH1_F	accggcagtgactaccagcag	60,0	NP_001044804.1	205
	RT2SH1_R	acggcgatctcctgttag	59,3		
Sh4	Sh4SNPd_R	gagagcacctcggagagc	59,7	NP_001174137.1	220
	Sh4SNPd_P	accagtgaatgacaagtgg	60,0		
OsCPL1	Os07g0207700_F	tatcttgccatgcagcagtc	60,0	NP_001059159.1	192
	Os07g0207700_R	ttgcttggggagtaggacag	60,2		
Genes relacionados a parede celular					
Os02g0170900	Os02g0170900_F	tgtggcgtgatcctcatgta	60,1	NP_001046030.1	195
	Os02g0170900_R	ttctgcaagggcacctatc	60,2		
OsCel9D	Os03g0329500_F	ttggccatccggtgatacc	60,6	NP_001050004.1	211
	Os03g0329500_R	tctgaacaagcatggcactc	60,0		
Os04g0480900	Os04g0480900_F	tgttggtgagaatgcaaagc	59,8	NP_001053105.1	197
	Os04g0480900_R	caggattgcaattcgatct	60,0		
Os09g0530200	Os09g0530200_F	ttcgttctgctcctgactt	60,0	NP_001063747.1	209
	Os09g0530200_R	acgatgatcctcgatggtgt	60,4		
Os11g0462100	Os11g0462100_F	gacaaccagtcagtggcaga	59,9	NP_001067864.1	185
	Os11g0462100_R	ttccaggactgtgatgcttg	59,8		
OsXTH8	Os08g0237000_F	ccatcattcgttctcatt	59,8	NP_001061319.1	196
	Os08g0237000_R	gtgctcactgtcagcatc	59,7		
Genes com possível ação sobre o degrane					
Os02g0613200	Primer pair 6_R	agacaaaacctggagctga	52,9	NP_001047418.1	210
	Primer pair 7_R	tactcgggtgcaacgcttat	52,8		
Os03g0745400	Primer pair 11_F	ggaggattgcagggatgtaa	51,0	NP_001174522.1	176
	Primer pair 11_R	aacaggccaacgagcaagt	54,0		
Os05g0117300	Primer pair 9_F	gatgatgatgtgtcctcca	51,0	NP_001054474.1	217
	Primer pair 9_R	cagaacggagaactgagtcg	52,0		
Os08g0512400	Primer pair 13_F	ccacctcaagaggcacatt	52,2	NP_001062218.1	203
	Primer pair 13_R	ctggcagaagatgcagttca	52,4		
Os10g0137700	Primer pair 5_F	cagctcagatcgatgtcca	59,9	NP_001064131.1	216
	Primer pair 5_R	aaaggagcctgtccagtcca	59,8		
Os11g0148700	Primer pair 15_F	tgaccgcgtcattgctgcct	59,3	NP_001065751.2	250
	Primer pair 15_R	actcccaaacggtcagtgccac	59,2		
Os01g0849100	Sh1_2_F	ttcagggacctccatttcag	60,0	NP_001044808.1	197
	Sh1_2_P	atggctcagctccttcaga	60,1		
Gene de controle endógeno/constitutivo					
28S rRNA ²	---	ctgatctctgtgaagggt	60,0	---	---
	---	tgatagaactcgtaatgggc	59,5		

1 = Temperatura em °C de pareamento do *primer*;

2 = utilizado como gene constitutivo.

As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de 95°C durante 5 min seguido de uma sequência de 40 ciclos: iniciado com 94°C por 15 seg, 60°C por 10 seg, 72°C por 15 seg e 60°C por 35 seg, e um ciclo final de desnaturação de 95°C por 15 seg, 60°C por 60 seg, 95°C por 15 seg e 60°C por 15 seg.

3.2.4 Análise da reação RT-PCR em tempo real

A análise foi iniciada pela interpretação da curva de dissociação para verificar a pureza do produto formado e confirmar a ausência de dímeros de iniciadores ou produtos inespecíficos. Placas que apresentaram comportamento anormal e amplificação do controle negativo foram descartadas. A amplificação realizada pela RT-PCR em tempo real foi analisada pela quantificação relativa, a qual determina o número de cópias de um gene alvo em relação a um controle endógeno, no caso 28S rRNA. O cálculo baseia-se, indiretamente, na separação dos Cts (*cycle threshold*) que correspondem aos ciclos de PCR nos quais o sinal de amplificação atinge um valor exponencial. Quanto maior for a quantidade inicial de cDNA, mais cedo o produto acumulado é detectado na PCR e menor será o valor de Ct. Posteriormente, calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

A quantificação relativa foi realizada pelo ajuste das curvas pela análise da eficiência da PCR através do software livre LinRegPCR (versão 12.2), que analisa a curva exponencial de amplificação. Valores de $R > 0,99$, com eficiência entre 1,8 e 2 e números de pontos maiores que 4 foram aceitos, os demais foram descartados não entrando na análise (Tuomi *et al.*, 2010).

O valor *threshold* para cada *primer* foi ajustado manualmente, procurando-se uma posição satisfatória para todas as amostras, sempre na fase logarítmica. A faixa de valores utilizados foi de 30.000 e 50.000. Para análise estatística foram utilizados valores das quaduplicatas de Ct não superiores a 0,5 de desvio padrão (Tuomi *et al.*, 2010).

A análise dos dados constou da obtenção dos valores de Ct e realização das médias das amostras em quadruplicatas com desvio padrão inferior a 0,5 de indivíduos calibradores e indivíduos alvo para cada gene. Esta análise foi realizada através da fórmula de Dussault & Pouliot (2006), onde o $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{28S}) - (Ct_{\text{calibrador}} - Ct_{28S})$, sendo o $\Delta\Delta Ct$ a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ fornece a dimensão de variação.

3.3 Genotipagem de populações de *Oryza* spp. quanto a genes relacionados ao degrane

As populações fenotipadas anteriormente foram analisadas quanto à variabilidade nucleotídica de genes relacionados ao degrane das sementes. Os genes analisados foram *qSH1*, *Sh4*, *CPL1*, *OsXTH8*, Os02g0613200, Os03g0745400, Os05g0117300, Os08g0512400, Os10g0137700, Os11g0148700 e Os01g0849100.

3.3.1 Extração de DNA

O material vegetal foi obtido das plantas semeadas em tanques de concreto na safra 2008/09 para a realização da fenotipagem do nível do degrane. O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de folhas jovens de plantas individuais através do protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) modificado (Doyle & Doyle, 1987).

O material vegetal foi macerado na presença de nitrogênio líquido (LN₂) e acondicionado em microtubos de 1,5 mL previamente resfriados. Quinhentos µL de tampão de extração (0,1 M Tris-HCl [pH 8,0], 0,02 M EDTA [pH 8,0], 1,4 M NaCl, 2% CTAB) foram adicionados a cada tubo, seguido por agitação

vigorosa. Após, os tubos foram incubados a 65°C por 30 min em banho-maria, com agitação dos tubos a cada 10 min. Em seguida, 500 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionada a cada tubo, misturado por 5 min e centrifugado a 10.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 75 µL de RNase (100 mg mL⁻¹) foram adicionados e incubados a 37°C durante 60 min. Após, o DNA foi precipitado com 300 µL de álcool isopropanol gelado, agitado gentilmente e acondicionado por 12 h a 4°C. No dia seguinte as amostras ficavam 10 min em temperatura ambiente e posteriormente eram centrifugadas por 30 min a 14.000 rpm e, o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 5 min a 10.000 rpm e novamente lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 min a 10.000 rpm. Após o descarte do etanol o precipitado foi secado por 20 a 30 min e ressuspendido em 30 µL de TE 0,1X, quantificado utilizando espectrofotômetro Genesys 2[®] (Thermo Spectronic) e diluído a 20 ng µL⁻¹.

3.3.2 Amplificação das regiões a serem sequenciadas

A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em termociclador PTC100[®] (MJ Research) e consistiu de 20 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada *primer*, 1x PCR buffer, 0,2 µM dNTPs, 0,25 U de Taq DNA Polymerase, 0,3 µL de DMSO e água miliQ em um volume total de 20 µL. O protocolo de reação consistiu de 3 min de incubação a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação da fita de DNA; 60°C por 1 min, para o pareamento dos *primers*; 72°C por 1,5 min para extensão da fita de DNA e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min. O desenho dos *primers* foi baseado

nos parâmetros descritos no item 3.2.2 com exceção do tamanho dos fragmentos amplificados. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídeo. Na Tabela 4 encontram-se as sequências dos *primers* utilizados, temperatura de pareamento, posição do *primer* no gene e tamanho do fragmento esperado.

TABELA 4. Sequências dos *primers* utilizados para sequenciamento, temperatura de pareamento, posição do *primer* no gene e tamanho do fragmento esperado

Gene	Primer	Sequência (5'→3')	Tm ¹	Posição do primer no gene	Origem da sequência	Fragmento esperado (pb)
Genes com ação comprovada sobre o degrane						
qSH1	qSh1SNP12kb_F	gtaaccttctctggcacagc	60,0	55521 ²	AP004127	510
	qSh1SNP12kb_R	gcggtagcacactagcatga	59,9	56030 ²		
Sh4	Sh4SNPd_F	acgggcacctgactgctac	60,0	95	NP_001174137.1	511
	Sh4SNPd_R	gagagcacctcggagagc	59,7	605		
OsCPL1	CPL1SNP123_F	tgctctccataccatgttc	59,8	3354	NP_001059159.1	491
	CPL1SNP123_R	cgagttgcttggggagtag	59,9	3844		462
	CPL1SNP4DEL_F	atttctcagcggcatttc	60,0	5199		
	CPL1SNP4DEL_R	accttctcagcgaggtgaa	60,2	5660		
Gene relacionado à parede celular						
OsXTH8	Seq237000a_F	gaagcatctcgcgctgc	60,8	6	NP_001061319.1	591
	Seq237000a_R	gtcgtccacctggaatctgt	60,0	596		571
	Seq237000b_F	accctacgtcatgaacacc	59,7	353		
	Seq237000b_R	gtcggcgagtagttgttag	60,8	923		
Genes com possível ação sobre o degrane						
Os02g0613200	Primer Pair 6_F	tgagctagctttgggggtg	53,3	6610	NP_001047418.1	496
	Primer Pair 6_R	agacaaaaccctggagctga	52,9	7105		
Os03g0745400	Primer Pair 10_F	gctgccttctcatctcaacc	52,8	2966	NP_001174522.1	501
	Primer Pair 10_R	cacctgcacaagcaacact	53,8	3466		
Os05g0117300	Primer Pair 8_F	tgtaagctcgcgaggtatgaga	53,3	730	NP_001054474.1	441
	Primer Pair 8_R	acaatgagcctttggtctgg	52,2	269 ³		
Os08g0512400	Primer Pair 12_F	gctgcaaatgcaaagagtga	51,8	1168 ⁴	NP_001062218.1	416
	Primer Pair 12_R	tggcctattccgtagtgc	51,6	1583 ⁴		
Os10g0137700	Primer Pair 4_F	tctagtcgacgtggggttt	52,8	35 ⁴	NP_001064131.1	452
	Primer Pair 4_R	cagggagcaatcagacgta	51,5	486 ⁴		
Os11g0148700	Primer Pair 14_F	tgacgtagcagctgtttgct	54,2	6677	NP_001065751.2	406
	Primer Pair 14_R	agaagtgttcagggcgaatg	52,4	7082		
Os01g0849100	Sh1_1_F	gcccttcattctacatcca	60,0	3267	NP_001044808.1	548
	Sh1_1_R	catgacaagcagaccagat	59,7	2720		

1 = Temperatura em °C de pareamento do *primer*;

2 = os números da posição dos *primers* são em relação à sequência AP004127 (NCBI) e amplificam fragmentos que possuem um SNP na posição 55783 desta sequência a 11841 bases *upstream* ao gene qSH1.

3 = Posição *downstream* do gene.

4 = Posição *upstream*.

3.3.3 Purificação

A purificação foi realizada pela adição do mesmo volume da quantidade da reação amplificada de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi

agitada durante 2 min e centrifugada a 10.000 rpm durante 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o DNA precipitado com o dobro do volume da quantidade da reação amplificada de álcool isopropanol gelado, agitado gentilmente e centrifugadas por 30 min a 10.000 rpm e, o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 80%, centrifugado por 5 min a 10.000 rpm. Após o descarte do etanol o precipitado foi seco por 15 min e ressuspensionado em 20 μL de TE 1X. A quantificação foi realizada através do espectrofotômetro Genesys 2[®] (Thermo Spectronic). Após, cada amostra foi diluída para a concentração de 10 ng μL^{-1} .

3.3.4 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer[®] que possui capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (50 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* da sequência de interesse e 2 μL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100[®]* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 μL . As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700[®]* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Depois de marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 μL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e

eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v1.0.1[®] (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set* “Z”; *Mobility File* “DT3100POP6(BDv3)v1.mob”; *BioLIMS Project* “3100_Project1”; *Run Module 1* “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e *Analysis Module 1* “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”.

3.3.5 Alinhamento

As sequências dos genes obtidas foram editadas pelo programa BioEdit (versão 7.0.5.3) (Hall, 1999). Após, estas sequências foram alinhadas através do programa ClustalW (versão 1.82). O alinhamento foi feito utilizando as ferramentas BLASTn e BLASTx (Altschul *et al.*, 1997) com base nas sequências dos genes previamente depositadas em banco de dados como *GenBank* e *Gramene*.

3.4 Identificação de genes expressos na zona de abscisão através da técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH)

O ecótipo de arroz vermelho AV 60 e a cultivar Batatais, que apresentaram alto e baixo nível de degrane dos grãos, respectivamente, foram utilizados para a identificação dos genes expressos na zona de abscisão através da técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH).

3.4.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras de RNA do ecótipo de arroz vermelho AV 60 e da cultivar Batatais obtidos para o estudo da expressão de genes relacionados ao degrane e parede celular (item 3.2) foram utilizados para a identificação de genes expressos na zona de abscisão. A obtenção de cDNA foi realizada pelo procedimento da transcrição reversa baseada no protocolo do Kit SMARTer[®] PCR cDNA Synthesis (Clontech) para que fossem formados fragmentos de fita simples de cDNA de comprimento mais completo possível e, que possuísem na fita formada um sítio de endonuclease e extensão conhecida, para facilitar a identificação do cDNA de interesse. Assim, para síntese da fita simples de cDNA, a partir de 1000 ng de RNA total, foi utilizada 200U da transcriptase reversa SuperScript III[®] (Invitrogen) e do iniciador composto por oligonucleotídeo (dT) modificado chamado *primer* T, a fim de capturar a cauda poliA⁺ do mRNA presente no RNA total, e acrescentar um sítio de restrição para a endonuclease *Rsa*I (em negrito) de *Primer* G (Tabela 5).

TABELA 5. Sequências dos *primers* para a síntese de cDNA

<i>Primer</i>	Sequências
<i>Primer</i> T	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG TACT ₍₃₀₎ V N3' (V = A, G ou C, N= A, C, G ou T)
<i>Primer</i> G	5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG TAC GC GGG 3'
<i>Primer</i> SS	5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'

Para cada reação foi utilizado 1 µg de RNA (1 µL), 1 µL de *primer* T a 12 µM, 1 µL de *primer* G a 12 µM, em um volume total de 5 µL, misturada, centrifugada e incubada por 2 minutos a 70°C em termociclador Eppendorf Mastercycler[®] (Eppendorf). Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente durante 1 min, e após receberam 2 µL de tampão 5X para primeira fita de cDNA (250 mM Tris-HCL, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM

MgCl₂), 1µL de ditiontreitol (DTT) a 20 mM e 1µL dNTP mix (10mM cada nucleotídeo), e incubados novamente por 2 minutos a 42°C. Em seguida foi adicionado a transcriptase reversa e incubado por 1 hora a 50°C. Ao final, procedeu-se a diluição adicionando 40 µL de tampão TE 1X (10 mM Tris pH 7,6, 1mM EDTA) e aquecimento das reações a 70°C por 15 min para inativar a transcriptase reversa. Após, o material resultante que consiste na fita simples de cDNA foi armazenado a -20°C. O desempenho e a qualidade da fita simples de cDNA foi verificada através de reação de PCR utilizando o primer 28S rRNA e visualização em gel de agarose 1%.

Uma vez formada a fita simples adequadamente, foram determinados os números ótimos de ciclos de PCR para as diferentes amostras. O número ótimo de ciclos permite a formação de cópias completas das fitas simples de cDNA suficientes para que genes de rara expressão sejam amplificados. Porém, deve-se utilizar o menor número de ciclos possíveis para visualizar em gel de agarose 1% a fim de evitar a formação de produtos inespecíficos na reação.

A reação de PCR utilizando a fita simples de cDNA como molde foi realizada com o kit Advantage[®] cDNA PCR & Polymerase (Clontech). Para cada reação foram utilizados 5 µL tampão 10X, 1 µL dNTPs Mix, 1 µL *primer* SS (Tabela 5), 1,5 µL de MgCl₂, 1 µL Taq Polymerase Mix (Invitrogen) e 1 ou 5 µL da fita simples de cDNA e quantidade de água deionizada suficiente para completar 50 µL de solução para reação. Após foram realizadas as reações de amplificação em termociclador Eppendorf Mastercycler[®] (Eppendorf). Foi utilizada a função de programação “*pause press enter*” para a coleta de alíquotas de 5 µL ao fim dos ciclos 14, 18, 22 e 26 (Figura 2). As etapas de

amplificação incluíram um ciclo inicial de 95°C por 2 min, e após ciclos de 95°C por 15 segundos, mais 60°C por 30 segundos e 68°C por 6 min.

Os produtos da amplificação foram visualizadas em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídeo (Figura 2), fotografadas e analisadas por programa “Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software 3.0”. De posse do número de ciclos ótimos de 20 vezes para as amostras A7 e A10 e de 26 para a amostra A1, procedeu-se a amplificação por PCR novamente com 1 µL da fita simples de cDNA.

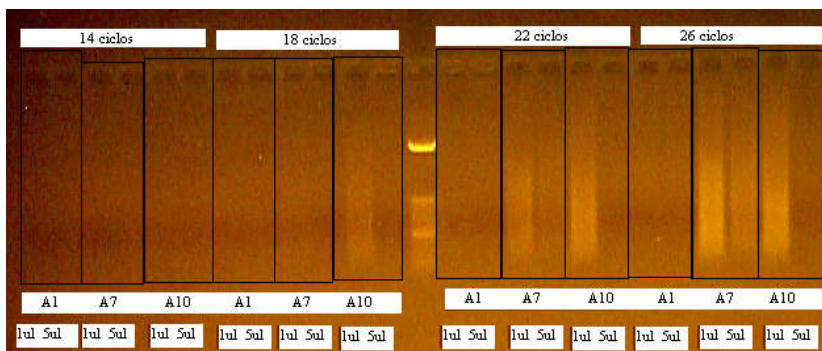


FIGURA 2. Otimização dos ciclos de PCR, com 14, 18, 22 ou 26 ciclos e 1 ou 5 µL de RNA. Amostra A1 = AV 60; Amostra A7 = Lacassine (não utilizado) e Amostra A10 = Batatais.

3.4.2 Digestão dos ds cDNAs com a enzima de restrição *Rsa I*

As duplas fitas dos cDNAs de AV 60 e Batatais foram clivados com a enzima *Rsa I* (Invitrogen). A reação de digestão foi composta por 43,5 µL dos cDNAs, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM de MgCl₂; 15 U da enzima *Rsa I* e água ultra pura até completar o volume de 50 µL. A reação foi incubada por 1,5 h a 37°C. Após, uma alíquota de 5 µL da reação incubada foi retirada para a análise da eficiência da digestão. Ao fim da reação foi adicionado EDTA na concentração final de 0,2 M com a função de inativar a enzima. Após, as soluções foram purificadas como descrito no item 3.3.3.

3.4.3 Ligação de adaptadores

Após a digestão e purificação os cDNAs *tester* foram preparados em função da ligação de adaptadores. O cDNA digerido de AV 60 foi renomeado para cDNA “A” e o cDNA digerido de Batatais foi renomeado para cDNA “B”. Uma alíquota de cada cDNA digerido, “A” e “B”, foi ligado em separado com os adaptadores 1 e 2R (Tabela 6), gerando quatro reações de ligação. As reações foram denominadas como A1; A2R; B1 e B2R. Duas reações de ligação adicionais, denominadas Ac e Bc, foram preparadas misturando alíquotas da reação A1 com A2R e B1 com B2R. Os produtos destas reações adicionais serão utilizados como para controles não subtraídos.

TABELA 6. Sequências de adaptadores e primers específicos

Nome	Sequência
Adaptador 1	5' CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT 3'
<i>Primer 1</i>	5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3' 5'TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT 3'
Adaptador 2R	5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT 3'
<i>Primer 2R</i>	5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3' 5'AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT 3'

Cada reação de ligação dos adaptadores foi composta por 5 µL de mistura de ligação (3 µL de água; 2 µL de tampão 5X e 1 µL de T4 DNA ligase (General HealthCare), 2 µL do cDNA digerido e purificado “A” ou “B” (diluído 1:5 – cDNA:água) e 2 µL do Adaptador 1 ou 2 µL Adaptador 2R (Tabela 7).

TABELA 7. Configuração das reações de ligação dos adaptadores nas amostras *tester*

Tubo	A1	A2R	B1	B2R
cDNA “A”	2 µL	2 µL	---	---
cDNA “B”	---	---	2 µL	2 µL
Adaptador 1	2 µL	---	2 µL	---
Adaptador 2R	---	2 µL	---	2 µL
Mistura de ligação	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

Após agitado e brevemente centrifugado (15 seg a 5000 RPM), as reações controles Ac e Bc foram preparadas misturando em um novo tubo 2 μ L do tubo A1 com 2 μ L do tubo A2R e 2 μ L do tubo B1 com 2 μ L do tubo B2R. Em seguida, os tubos foram incubados durante 14 h a 16°C. Para finalizar a reação foi adicionado 1 μ L da mistura EDTA/glicogênio e a enzima T4 DNA *ligase* foi desnaturada aquecendo as amostras durante 5 min a 72°C.

A configuração da análise de eficiência da ligação foi realizada conforme a Tabela 8. Foram usados *primers* específicos para os adaptadores (Tabela 6) e o *primer* de 28S rRNA (Tabela 3). Após amplificação, foram visualizadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo (Figura 3).

TABELA 8. Configuração da análise de eficiência da ligação dos adaptadores

Componente	Tubo (μ L)			
	1	2	3	4
Tester A1*	1	1	--	--
Tester A2R	--	--	1	1
28S rRNA 3'	1	1	1	1
28S rRNA 5'	--	1	--	1
PCR primer 1	1	--	1	--
Total	3	3	3	3

* A mesma configuração foi utilizada para a análise da eficiência dos Tester B1 e B2R.



FIGURA 3. Resultado da análise da eficiência da ligação dos adaptadores nas amostras *tester* em gel de agarose 1%.

3.4.4 Hibridização subtrativa

Duas subtrações foram realizadas, uma no sentido direto e outra no sentido reverso (Tabela 9). Para cada subtração, os cDNAs ligados aos adaptadores são denominados como cDNA *tester* e os cDNAs não ligados são denominados como *driver*.

Os cDNAs *testers* (AV 60) foram hibridizados independentemente com um excesso de cDNA *driver* “B” digerido e purificado (Batatais), subtraindo no sentido direto. Da mesma forma, os cDNAs *testers* B1 e B2R (Batatais) foram hibridizados independentemente com um excesso de cDNA *driver* “A” digerido e purificado (AV 60), subtraindo no sentido reverso.

TABELA 9. Estratégia de obtenção das subtrações nos sentidos direto e reverso para a análise da expressão gênica diferencial na região pedicelo-flor

Nome da biblioteca	Sentido	Tester	Driver	Subtração
PD	Direto	AV 60	Batatais	Genes relacionados à presença de degrane
AD	Reverso	Batatais	AV 60	Genes relacionados à ausência de degrane

3.4.5 Hibridização subtrativa primária

Cada reação de hibridização subtrativa primária foi composta por 1,0 µL de tampão de hibridização 4X (4 M de NaCl; 200 mM de HEPES (pH 8,3) e 4 mM de CTAB), 1,5 µL de cDNA driver e 1,5 µL de cDNA tester (Tabela 10).

TABELA 10. Configuração das reações de hibridização subtrativa primária das bibliotecas no sentido direto e reverso

Tubo	Biblioteca sentido direto		Biblioteca sentido reverso	
	1	2	3	4
Driver “A”	---	---	1,5 µL	1,5 µL
Driver “B”	1,5 µL	1,5 µL	---	---
Tester A1	1,5 µL	---	---	---
Tester A2R	---	1,5 µL	---	---
Tester B1	---	---	1,5 µL	---
Tester B2R	---	---	---	1,5 µL
Tampão de hibridização	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL

A reação foi incubada no termociclador Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 98 °C por 1,5 min e após, redução para 68 °C durante 8 h.

3.4.6 Hibridização subtrativa secundária

As duas amostras da hibridização subtrativa primária de cada biblioteca subtrativa foram misturadas, e *driver* em excesso foi adicionado para enriquecer as sequências diferencialmente expressas. A reação de hibridização subtrativa secundária foi constituída de 1 µL do cDNA *driver* “A” ou “B”; 1 µL do tampão de hibridização e 2 µL de água deionizada. A reação com o cDNA *driver* foi incubada no termociclador a 98 °C por 1,5 min. Após, foram adicionados ao cDNA *driver* as duas amostras de cada cDNA *tester* (1 e 2R) provenientes da hibridização subtrativa primária. A reação foi incubada no termociclador a 68°C por 12 h. Após foram acrescentados 200 µL do tampão de diluição contendo 20 mM de HEPES (HCl pH 8,3); 50 mM de NaCl e 0,2 mM de EDTA e novamente incubada no termociclador a 68°C por 7 min.

3.4.7 Amplificação supressiva primária

Os cDNAs diferencialmente expressos foram seletivamente amplificados durante duas reações de PCR. Na amplificação supressiva primária, somente os cDNAs fita dupla com adaptadores foram exponencialmente amplificados. A amplificação supressiva primária foi constituída de 1 µL da reação de hibridização subtrativa secundária; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 0,4 µM do *primer* 1 (5'-ctaatacgactcactatagggc-3'); 1 U de Taq *Platinum* DNA polimerase® (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 25 µL. A reação foi incubada no

termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 75°C por 5 min, 27 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 s, pareamento a 64°C por 30 s e extensão a 72°C por 1,5 min. Os produtos das amplificações foram diluídos 10 vezes e utilizados para a reação de amplificação supressiva secundária.

3.4.8 Amplificação supressiva secundária

A amplificação supressiva secundária foi constituída de 1 µL da reação obtida na amplificação supressiva primária; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dNTP; 0,4 µM de *primer* NP1 (5'-tcgagcggccgcccgggcaggt-3') e NP2R (5'-agcgtggtcgcgccgaggt-3'); 1 U de Taq *Platinum* DNA polimerase[®] (Invitrogen) e água deionizada até completar o volume de 25 µL. A reação foi incubada no termociclador nas seguintes condições: 12 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 s, pareamento a 68°C por 30 s e extensão a 72°C por 1,5 min. Os produtos da amplificação secundária supressiva foram digeridos com a enzima *Rsa I* conforme o item 3.4.2 e posteriormente purificados conforme o item 3.3.3.

3.4.9 Ligação dos cDNA-SSH no vetor pGEM[®]-T Vector Systems

Para a ligação dos fragmentos no vetor pGEM[®]-T (Promega) seguiram-se as instruções do fornecedor. A reação foi composta de 11 ng dos cDNAs diferencialmente expressos purificados; 50 ng do vetor pGEM[®]-T; 5 µL de tampão de ligação contendo 60 mM de Tris-HCl (pH 7,8); 20 mM de MgCl₂; 20 mM de DTT; 2 mM de ATP; 10% de polietilenoglicol 8.000; 3 U de T4 DNA

ligase e água ultra pura até completar o volume de 10 μL . A reação foi incubada por 24 h a 4°C.

3.4.10 Transformação dos produtos das reações de ligação

Os produtos das reações de ligação foram usados para transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* utilizando o eletroporador MicroPulser® (BIO RAD), seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, 2 μL da reação de ligação foram misturados a 50 μL de células eletrocompetentes e incubadas durante 1 min no gelo, seguindo da eletroporação em cubetas de 0,1 cm (BIO RAD). Em seguida foi aplicado um pulso de 1,8 kV e, imediatamente, foi acrescentado 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido e, após serem ressuspendidas por pipetagem, as células foram transferidas para tubos de vidro e incubadas por 1 h a 37°C sob agitação de 225 rpm. Após 1 h, as células foram plaqueadas, sendo duas placas para cada transformação. Na primeira placa, uma alíquota de 100 μL das bactérias foi plaqueada em meio LB sólido. Na segunda, o restante do volume da transformação (900 μL) foi precipitado por centrifugação a 4.000 x g por 10 min a 4 °C, ressuspendido em 100 μL de meio LB líquido e plaqueado em meio LB sólido. Nos dois casos, o meio LB foi acrescido de 0,8 mg de X-Gal e de 0,8 mg de IPTG. As placas foram incubadas por aproximadamente 20 h a 37°C.

As colônias recombinantes foram repicadas para placas de Petri contendo meio LB sólido mais 0,8 mg de X-Gal, 0,8 mg de IPTG, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico ampicilina e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico tetraciclina, no meio LB sólido.

3.4.11 Análise das colônias transformadas pela PCR

Em câmara de fluxo laminar parte de cada colônia foi adicionada à reação da PCR com o auxílio de uma ponteira de 0,2 mL autoclavada. A reação foi constituída de 300 µM de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 0,4 µM de primer M13 F (5'- gtaaacgacgccag -3') e M13 R (5'- caggaaacagctatgac -3'); 1 U de *Taq Platinum* DNA polimerase® (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 20 µL. A reação foi incubada no termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 10 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 min, pareamento a 50°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os fragmentos amplificados foram purificados e sequenciados utilizando o *primer* M13 conforme os itens 3.3.3 e 3.3.4, respectivamente.

3.4.12 Análise da similaridade das sequências

As sequências obtidas em função do sequenciamento foram analisadas através do programa BioEdit (versão 7.0.5.3) (Hall, 1999). As sequências foram submetidas ao programa VecScreen (Altschul *et al.*, 1997), a fim de identificar regiões complementares aos plasmídeos. Após, foi realizada a comparação das sequências obtidas com as sequências de nucleotídeos (BLASTn) e proteínas (BLASTx) depositadas no *GenBank* (Altschul *et al.*, 1997). As proteínas foram agrupadas em categorias funcionais, utilizando o programa COGs (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/COG) do NCBI.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fenotipagem dos genótipos de arroz quanto ao degrane através de método quantitativo

A análise da resistência à tensão de ruptura (RTR) efetuada nos terços superior, mediano e inferior da panícula, realizada na safra 2008/09, indicou que somente três dos trinta e seis genótipos apresentavam diferentes níveis de degrane em relação aos terços da panícula. A RTR foi maior no terço inferior do que nos terços superior e mediano para os genótipos de arroz vermelho AV 04A e AV 144 (Figura 4). Já para o arroz cultivado Lacassine, a RTR foi menor no terço inferior quando comparado com os terços superior e mediano. A avaliação qualitativa do degrane em seis ecótipos de arroz vermelho provenientes do estado americano do Mississippi mostrou que o degrane iniciou no ápice da panícula, 21 dias após 50% das plantas atingirem à fase da antese (Do Lago, 1982). Entretanto, cinco dias após o início do degrane no ápice das panículas, o degrane na parte de baixo já era semelhante ao do ápice. Assim, no momento da maturação fisiológica das sementes, que foi o momento da avaliação do degrane realizada neste trabalho, havia a ocorrência de degrane em toda a panícula.

Os resultados da RTR considerando a panícula como um todo mostram a formação de três grupos distintos (Figura 5). No primeiro grupo que compreende da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* até o genótipo de arroz vermelho AV 144 a RTR foi de até 70 gf. Este grupo foi o que apresentou maior nível de degrane e era composto inteiramente por genótipos de arroz vermelho, e pela espécie silvestre de *O. glumaepatula*. Quanto menor a RTR maior é o nível de degrane do genótipo. Já o segundo grupo, que compreendia da cultivar Sator CL até a cultivar Epagri 109, apresentou RTR entre 77 e 115 gf. Neste grupo o degrane foi moderado e era composto por dois genótipos de arroz vermelho e diversas cultivares de arroz. No terceiro grupo estavam presentes genótipos de arroz com RTR acima de 128 gf que compreenderam desde a cultivar Fanny até a cultivar Nipponbare.

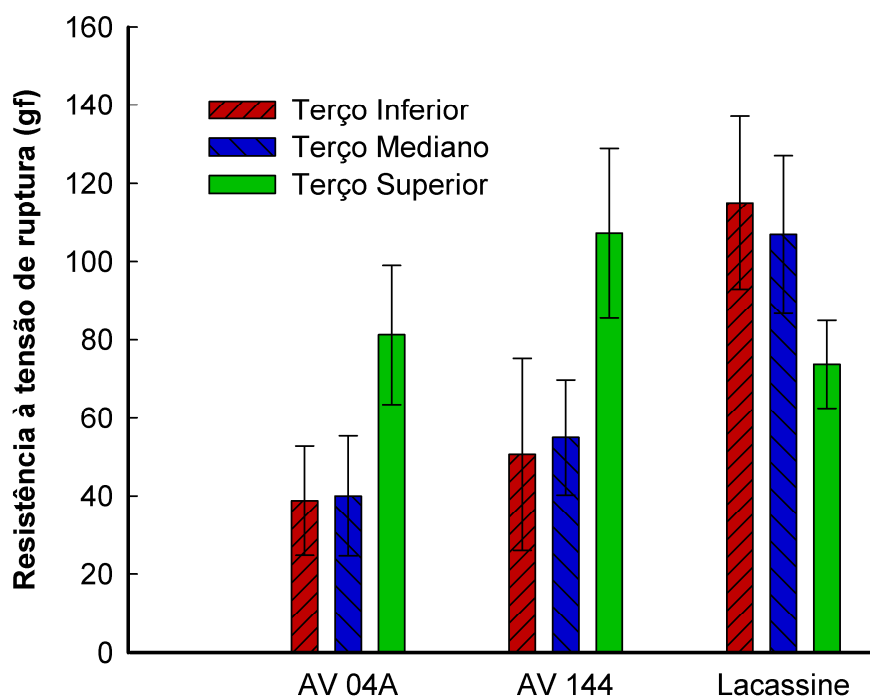


FIGURA 4. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo no momento da maturação fisiológica das sementes nos ecótipos que apresentaram diferença entre os terços da panícula.

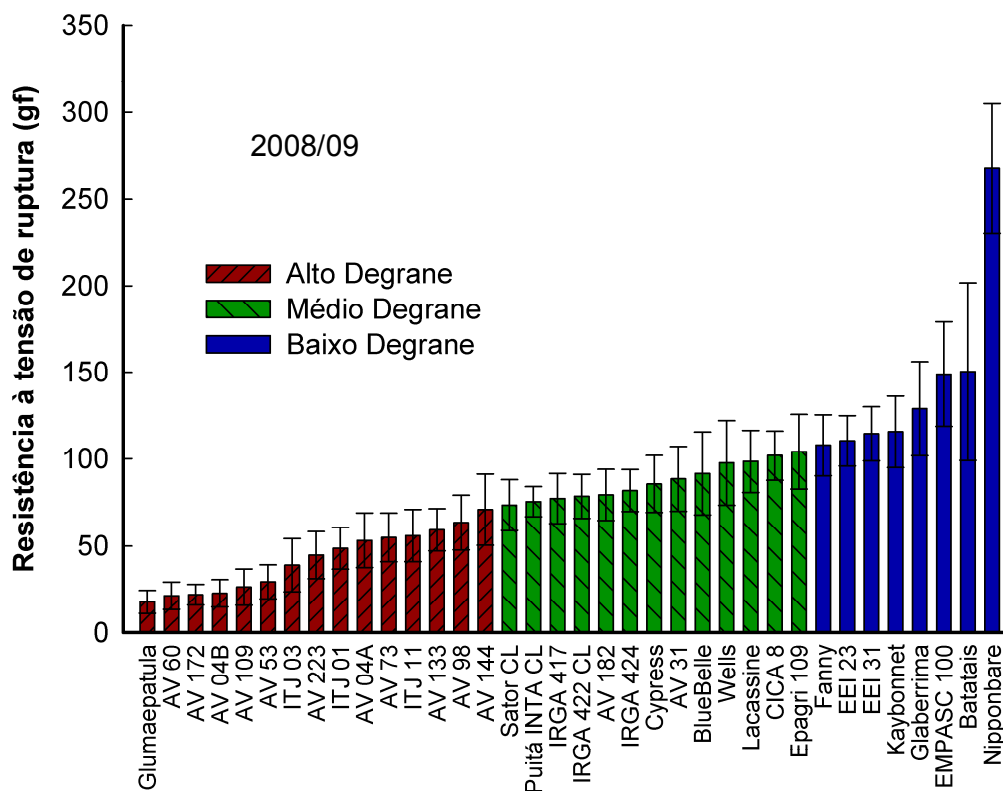


FIGURA 5. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo no momento da maturação fisiológica das sementes na média dos três terços das panículas dos genótipos avaliados na safra 2008/09.

Na safra 2010/11, foi realizada uma segunda fenotipagem com os mesmos genótipos para a validação dos resultados da primeira determinação na safra 2008/09. Nesta segunda avaliação, a média geral da RTR foi de 73,0, inferior a da avaliação de 2008/09, que foi de 80,8 gf. A análise da variância das duas avaliações em conjunto mostrou haver diferença entre as avaliações ($p < 0.0001$). Dos 36 genótipos de arroz analisados, somente AV 172 e ITJ 01 mudaram consideravelmente de nível do degrane de uma avaliação para outra (Figura 6). Ambos apresentaram valores de RTR superiores em relação à fenotipagem anterior. Outras quatro cultivares, Puitá INTA CL, Fanny, Wells, CICA 8, e um ecótipo de arroz vermelho, AV 182, apresentaram pequena

alteração na magnitude do degrane em comparação com a determinação anterior. Entretanto, estes genótipos se encontram em regiões de transição tanto na primeira quanto na segunda avaliação. O fato de apenas dois genótipos apresentarem nível de degrane diferente entre as avaliações mostra que a metodologia quantitativa empregada é precisa e possui reprodutibilidade. Portanto, este procedimento pode ser utilizado com segurança para a seleção de materiais com degrane contrastantes para utilização nos estudos de determinação dos processos envolvidos na variação desta característica.

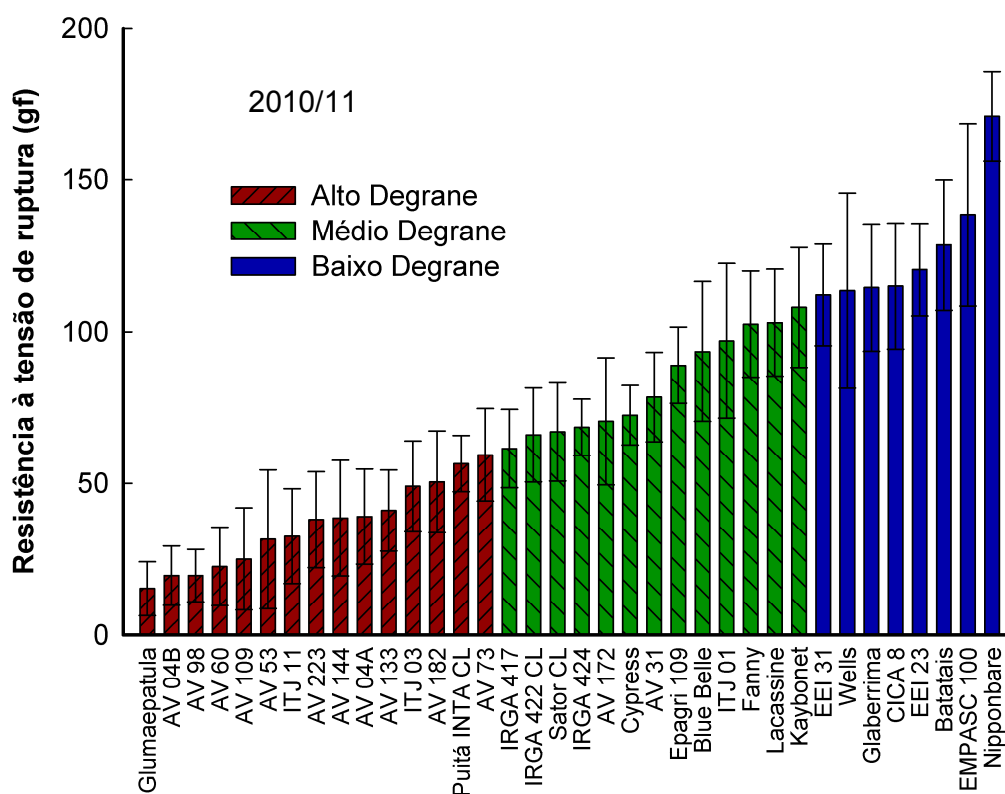


FIGURA 6. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo no momento da maturação fisiológica das sementes nos genótipos de arroz avaliados na safra 2010/11.

Os resultados acima evidenciam o potencial que o degrane possui na dispersão das sementes e perpetuação dos ecótipos de arroz vermelho. Além disso, os resultados indicam que os ecótipos de arroz vermelho apresentam

pouca variabilidade fenotípica com relação ao degrane. Entretanto, a variabilidade fenotípica aumenta quando consideramos os cultivares de arroz. Isto é devido ao processo de domesticação do arroz que está diretamente relacionado à redução do degrane natural das sementes desta cultura (Zhang *et al.*, 2009).

Ecótipos de arroz vermelho provenientes de lavouras de arroz irrigado dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina também foram pouco variáveis em relação ao degrane das suas sementes na fase da maturação (Schwanke *et al.*, 2008). Dos 16 ecótipos avaliados, 11 apresentaram fácil degrane, quatro foram de degrane intermediário e apenas um ecótipo apresentou difícil degrane. Nesta mesma avaliação, as cultivares BR-IRGA 409 e 410 e El Paso L 144 foram classificados como de degrane intermediário, e IRGA 417 de difícil degrane (Schwanke *et al.*, 2008). Na fenotipagem de 373 genótipos de arroz da subespécie *índica* originários da China, 293 genótipos apresentaram fácil degrane, enquanto que somente 25 genótipos apresentaram difícil degrane (Huang *et al.*, 2010). Com relação ao comportamento do degrane nas espécies de arroz fica evidente que *O. glaberrima* se encontra em elevado processo de domesticação. Esta espécie é cultivada na África e em alguns locais do Brasil.

A magnitude dos dados da RTR obtidos nas duas avaliações variou entre 20 e 260 gf. Estes valores estão coerentes com os obtidos por Akasaka e colaboradores (2011) onde a RTR das cultivares e ecótipos de arroz vermelho foi entre 20 e 220 gf. Além disso, a análise da RTR em *O. sativa* e *O. nivara* apresentou valores entre 50 e 200 gf (Li *et al.*, 2006b). Assim, os valores obtidos de RTR no presente estudo são comparáveis às avaliações

relacionadas ao degrane em sementes de arroz que vem sendo utilizadas para o estudo dos fenômenos fisiológicos e processos moleculares responsáveis pela ocorrência desta característica.

4.2 Expressão de genes relacionados ao degrane e parede celular na junção entre o pedicelo e a flor

A partir dos genótipos fenotipados no item 4.1 foram selecionados os ecótipos de arroz vermelho, AV 60 e AV 31 e as cultivares de arroz Lacassine e Batatais que apresentaram níveis contrastantes de degrane (Figura 5). Estes genótipos foram novamente cultivados na safra de 2009/10 para realização desta avaliação. A determinação do degrane dos materiais selecionados foi novamente realizada no momento da coleta do material vegetal para a extração do RNA aos dez dias após a polinização e no momento da maturação fisiológica das sementes (Figura 7). Aos dez dias após a polinização a resistência à tensão de ruptura (RTR) não diferiu entre as quatro populações avaliadas (Figura 7A). Entretanto, no momento da maturação fisiológica das sementes a RTR do AV 60, AV 31, Lacassine e Batatais foi 26, 53, 102 e 159 gf, respectivamente, (Figura 7B) a semelhança dos resultados obtidos nas duas avaliações onde foram avaliados todos os genótipos deste estudo (Figura 5 e 6).

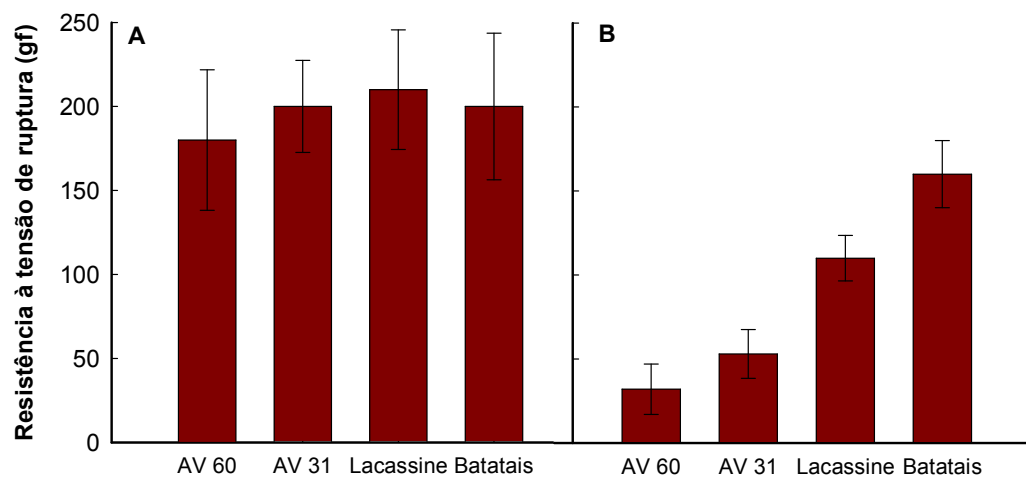


FIGURA 7. Resistência à tensão de ruptura do grão no pecíolo. A) dez dias após a polinização; B) no momento da maturação fisiológica das sementes.

4.2.1 Genes com efeito comprovado sobre o degrane

Atualmente, existem três genes com efeito comprovado sobre o degrane, *qSH1*, *Sh4* e *OsCPL1*. O gene *qSH1* não foi expresso na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização (Figura 8). A Figura 8 mostra a curva de amplificação para o controle endógeno 28S rRNA e o gene *qSH1*, sendo possível visualizar que todas as quadruplicatas e repetições biológicas apresentaram expressão para o controle endógeno. Entretanto, para o gene *qSH1* nenhuma amostra apresentou expressão. Ainda na Figura 8 é possível visualizar uma pequena emissão de fluorescência por parte de algumas amostras com o *primer* do gene *qSH1*. Essa baixa emissão de fluorescência não indica a expressão do gene nas plantas avaliadas. Provavelmente, isto ocorre em função da formação de dímeros de *primers* nestas amostras e a amplificação destes dímeros faz com que ocorra essa emissão de fluorescência.

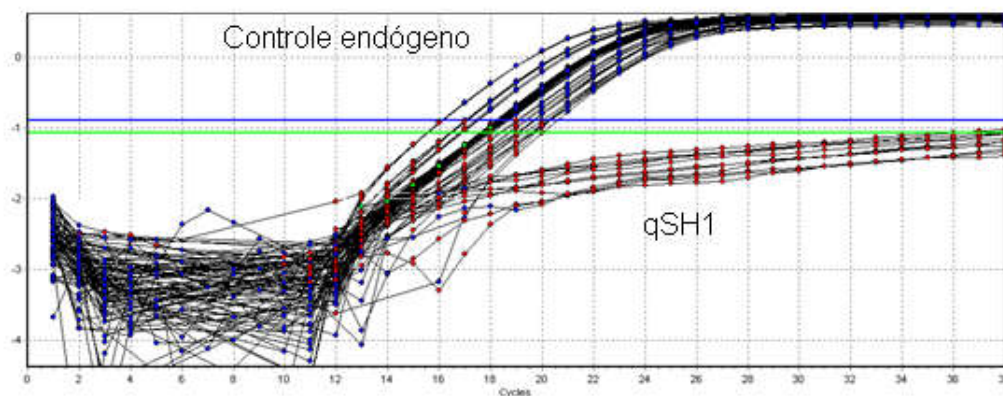


FIGURA 8. Curva de amplificação em PCR em tempo real para o controle endógeno 28S rRNA e *qSH1* conforme ajuste obtido através do programa LinRegPCR.

A substituição do nucleotídeo G por T na região regulatória 5' deste gene, a 11841 bases *upstream*, causa a perda da expressão do gene *qSH1* somente na região entre o pedicelo e a flor (Konishi *et al.*, 2006). Entretanto, a variabilidade nucleotídica dos ecótipos de arroz vermelho e das cultivares de arroz realizada (item 4.3) mostrou, com exceção da cultivar Nipponbare, que na posição 11841 bases *upstream* do gene *qSH1* a base presente era G. Dessa forma era esperado que houvesse expressão do gene *qSH1* na maioria dos ecótipos e cultivares analisados. Cabe lembrar que o trabalho que verificou a mutação a 11841 bases *upstream* utilizou ecótipos oriundos da subespécie japonesa (Konishi *et al.*, 2006). No presente estudo, nenhum dos quatro genótipos em que foi avaliada a expressão gênica pertence à subespécie japonesa.

O gene *Sh4* apresentou expressão na região entre o pedicelo e a flor (Figura 9). Entretanto, a expressão deste gene não mostrou uma relação direta com a ocorrência do deigrane. A expressão do gene *Sh4* na cultivar Batatais não difere dos ecótipos AV 60 e AV 31. Já a cultivar Lacassine apresentou um menor nível de expressão em comparação aos demais ecótipos e a cultivar

Batatais. A expressão do gene *Sh4* foi detectada na região entre o pedicelo e a flor em diferentes momentos na cultivar da subespécie índica CL 16 e em um ecótipo do arroz silvestre *Oryza nivara* (Li *et al.*, 2006b). Até os seis dias após a polinização não houve diferença na expressão do gene *Sh4* entre a espécie cultivada e a silvestre. Após, os níveis de expressão foram maiores na espécie silvestre em relação a cultivar CL 16 que possui um menor nível de degrane (Li *et al.*, 2006b). O aumento da expressão deste gene no momento da maturação das sementes mostra que o gene *Sh4* possui um importante papel na ativação do processo de abscisão. Dessa forma, não era esperado níveis de expressão do gene *Sh4* semelhantes entre a cultivar Batatais e os ecótipos de arroz vermelho AV 31 e AV 60. Como a cultivar Batatais possui menor degrane em relação aos ecótipos de arroz vermelho, era esperada uma menor expressão, como a apresentada pela cultivar Lacassine. Entretanto, existe uma série de mecanismos reguladores pós-transcricionais que podem fazer com que a maior expressão do mRNA de *Sh4* não concretize em um maior nível de proteína Sh4 e conseqüentemente maior nível de degrane. Existe ainda a possibilidade de que o gene *Sh4* da cultivar Batatais possua mutações que não modifiquem a sua expressão, mas tornem a proteína Sh4 menos efetiva. Assim, uma maior expressão do gene não resultaria em maiores níveis de degrane no fenótipo.

O gene *OsCPL1* foi expresso na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização e apresentou uma relação direta com o nível de degrane (Figura 9). Nos ecótipos que possuem degrane, AV 60 e AV 31 a expressão do gene foi superior em relação às cultivares que possuem menor nível de degrane. Dessa forma, a expressão do gene *OsCPL1* estaria relacionada com a ativação do processo de abscisão. O contraponto é que a

expressão no ecótipo AV 31 foi cinco vezes maior em comparação ao ecótipo AV 60. Esta diferença na expressão nos ecótipos não se concretizou em um maior nível de degrane no AV 31 em relação ao AV 60. Um dos motivos para isso seriam as modificações pós-transcricionais e pós-traducionais que o mRNA e a proteína do gene *OsCPL1* podem sofrer, respectivamente.

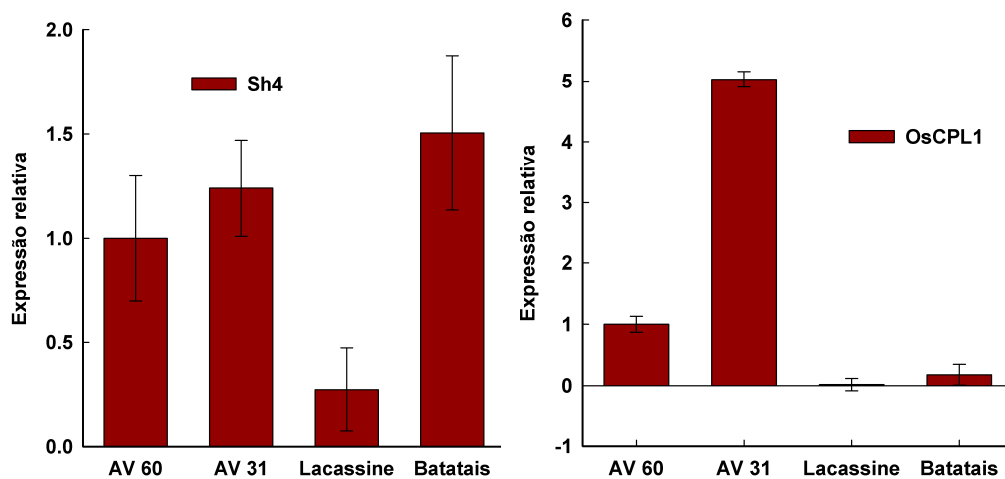


FIGURA 9. Expressão relativa de genes com relação comprovada sobre o degrane, aos dez dias após a polinização.

O padrão de expressão do gene *OsCPL1* foi detalhado através da geração de plantas transgênicas expressando o gene repórter *GUS* sobre o controle do promotor do gene *OsCPL1* (Ji *et al.*, 2010). Análises histoquímicas mostraram expressão do gene *GUS* na região da camada de abscisão no início do desenvolvimento das sementes, e com o progresso da maturação fisiológica das sementes a expressão do gene foi diminuindo. Além disso, foi observado que quanto maior a expressão do gene *OsCPL1* menor o nível de degrane (Ji *et al.*, 2010). Este padrão de expressão mostra que o gene *OsCPL1* está envolvido na repressão do desenvolvimento da camada de abscisão em sementes de arroz. Dessa forma, a relação entre a expressão deste gene e o nível de expressão em AV 60, AV 31, Lacassine e Batatais se apresentou ao

contrário do que era esperado. Pois, nestes ecótipos e cultivares a expressão do gene estaria relacionado com a presença do degrane e não com a repressão do degrane como o observado nas análises histoquímicas do estudo de Ji *et al.*, (2010).

A explicação para a diferença observada neste trabalho em relação à verificada na literatura pode estar na composição nucleotídica do gene *OsCPL1*. No fim do intron sete Ji *et al.* (2010) encontraram um SNP (A para T) na posição 5498 do gene que causa uma deleção de 15 pares de bases no mRNA em função de um *splicing* alterado, fazendo com que o fenótipo apresente degrane (Ji *et al.*, 2010). Entretanto, nenhum dos genótipos avaliados neste trabalho apresentou o SNP esperado (item 4.3.1). Além disso, no exon seis foi observado pelos autores três mutações que também não foram encontradas nos 36 genótipos utilizados neste trabalho (Tabela 2). Assim, a deleção de 15 pares de bases no mRNA em função de um *splicing* alterado pode ter feito com que o gene *OsCPL1* tenha tido uma inversão do padrão de expressão. Portanto, a composição nucleotídica diferenciada do gene *OsCPL1* pode explicar os resultados obtidos.

4.2.2 Genes relacionados à parede celular

Um total de seis genes relacionados à parede celular foram avaliados quanto à expressão relativa. Estes genes foram selecionados devido à participação das enzimas codificadas por eles em processos relacionados à quebra de ligações químicas que permitem desde uma nova conformação da parede celular até a degradação das mesmas (Roberts *et al.*, 2002). Os genes Os09g0530200 e Os11g0462100 que codificam enzimas do tipo *endo-beta-1,4-*

glucanase e *glycoside hydrolase*, respectivamente, não apresentaram expressão na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização (dados não apresentados).

Os genes Os04g04480900 e Os02g0170900 que codificam enzimas do tipo *glycoside hydrolase* e *lytic transglycosylase*, respectivamente, foram expressos, mas não apresentaram uma relação direta com nível de degrane (Figura 10). Para o gene Os04g04480900 a expressão relativa em Lacassine foi de quase cinco vezes em relação aos demais genótipos que mantiveram expressão relativa igual ao controle AV 60. Já expressão relativa do gene Os02g0170900 foi semelhante ao controle AV 60, com exceção do genótipo Lacassine que teve uma expressão relativa de 0,4 em comparação ao controle (Figura 10).

O padrão de expressão do gene *OsXTH8* (sinônimo *OsXRT5*), que codifica uma enzima *xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase* mostrou relação direta com a presença do degrane, pois nos ecótipos de arroz vermelho a expressão do gene foi superior em comparação às cultivares de arroz onde o degrane é ausente (Figura 10). As enzimas do tipo *xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase* catalisam a clivagem de polímeros de xiloglucanas e a sua transferência para outros polímeros de xiloglucanas. Além disso, estas enzimas desprendem a parede celular para a expansão celular regulada pelo turgor (Rose *et al.*, 2002). O gene *OsXTH8* é expresso em elevados níveis em células que estão ativamente em processo de alongamento e diferenciação. Plantas transgênicas silenciadas para o gene *OsXTH8* apresentam crescimento limitado (Jan *et al.*, 2004). Assim, durante o processo de abscisão, a expressão deste gene poderia facilitar a queda natural do grão

através da clivagem de polímeros da parede celular permitindo que as células da camada de abscisão rompessem com o menor esforço possível.

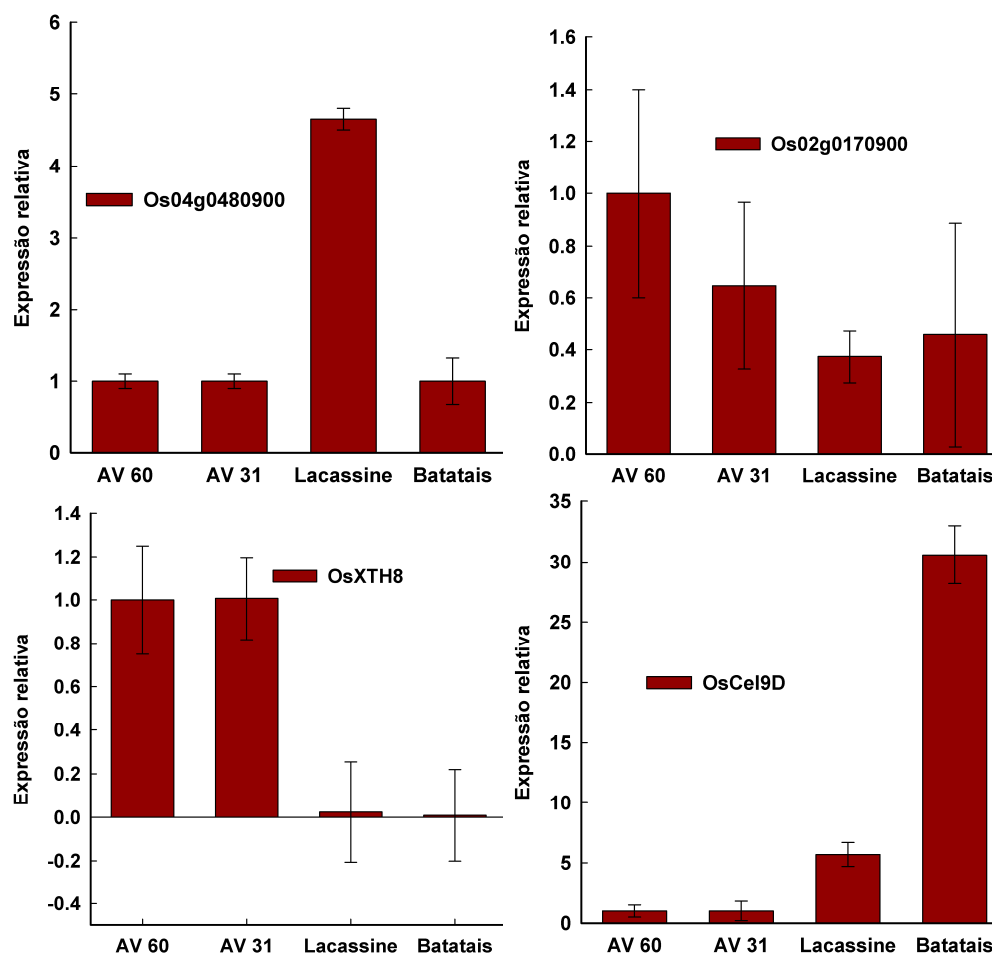


FIGURA 10. Expressão relativa de genes relacionado a parede celular, aos dez dias após a polinização.

A expressão relativa do gene *OsCel9D* (sinônimo *OsGLU1*) também apresentou associação com o degrane. Entretanto, esta relação é inversa daquela presente no padrão de expressão do gene *OsXTH8*, pois para o gene *OsCel9D* a expressão estaria relacionada com a repressão do processo de abscisão (Figura 10). Para o ecótipo de arroz vermelho AV 31 o nível de expressão foi igual ao controle AV 60, enquanto que nas cultivares de arroz Lacassine e Batatais, a expressão relativa foi de cinco e 30 vezes superior ao controle, respectivamente (Figura 10).

O gene *OsCel9D* codifica uma proteína do tipo endo-1,4-beta-glucanase. No genoma do arroz, endo-1,4-beta-D-glucanases formam uma família gênica com 15 membros e cada um possui um padrão de expressão distinto em diferentes órgãos (Zhou *et al.*, 2006). Esta família possui papel importante nos processos de crescimento e desenvolvimento em plantas de arroz (Zhou *et al.*, 2006). Um elevado nível de expressão do gene *OsCel9D* foi observado em calos de sementes de arroz. Contrariamente, em calos de raízes, a expressão deste gene não foi observada (Yoshida *et al.*, 2006). Mutações no gene *OsCel9D* reduzem o alongamento celular e o conteúdo de celulose, mas aumentam o conteúdo de pectina (Zhou *et al.*, 2006), sugerindo que *OsCel9D* esteja relacionado com os componentes da parede celular das plantas de arroz. Dessa forma, a mudança dos componentes da parede celular, causada pelo maior nível de expressão do gene, poderia dificultar o processo de abscisão em comparação com ecótipos que apresentam degrane.

4.2.3 Genes com possível ação sobre o degrane

A redução de custos e a maior eficiência no sequenciamento de genomas estão permitindo estudos de impacto através da associação entre genomas e fenótipos (Clark, 2010). Neste sentido, o sequenciamento e a fenotipagem de 517 genótipos de arroz da China permitiu criar um mapa de haplótipos onde sete possíveis genes relacionados ao degrane foram descobertos nos cromossomos dois, três, cinco, oito, dez, onze e doze (Huang *et al.*, 2010). No presente trabalho, seis desses sete possíveis genes com relação ao degrane foram avaliados quanto à sua expressão na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização. O possível gene localizado no

cromossomo doze não foi avaliado, pois a sequência dos nucleotídeos descrita no trabalho não conferem com a presente no banco de dados na posição indicada pelos autores. Além destes genes, nesta seção foi incluído o gene Os01g0849100 posicionado a 34kb *upstream* ao gene *qSH1*.

Dos seis genes com possível relação ao degrane em função do mapa de haplótipos propostos por Huang *et al.*, (2010), os genes Os02g0613200, Os05g0117300 e Os10g0137700 não foram expressos na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização (dados não apresentados). O fato de não apresentarem expressão nesta região e momento não significa que estes genes não estejam relacionados ao degrane, pois em outro momento os mesmos podem ser expressos e atuar sobre esta característica. As informações sobre o gene Os02g0613200 são escassas, sendo que nos bancos de dados *GeneBank* e *Gramene* as informações se referem como um gene que possivelmente codifica uma proteína conservada. A possível proteína codificada pelo gene Os05g0117300 possui alta similaridade com proteínas da família CLAVATA3/ESR. O tratamento com peptídeos oriundos da família CLAVATA3/ESR inibiu o alongamento celular em raízes de arroz e *Arabidopsis thaliana* (Kinoshita *et al.*, 2007). Além disso, genes desta família estão relacionados à formação de meristemas e a regulação do desenvolvimento vascular (Ito *et al.*, 2006). Dados oriundos de banco de dados do genoma do arroz mostram que existem 47 possíveis genes CLAVATA3/ESR com múltiplos domínios CLAVATA3/ESR, indicando que esta família gênica possui funções diversas em plantas de arroz.

O gene Os10g0137700 codifica uma proteína F-box do tipo ciclina (Skowyra *et al.*, 1997). Estas proteínas são receptores que recrutam substratos

fosforilados para o complexo *SCF ubiquitin-ligase*. Além disso, as proteínas F-box estão relacionadas com a sinalização hormonal e possuem um papel na regulação no desenvolvimento de plantas (Yu *et al.*, 2007). Assim, este gene poderia estar envolvido na sinalização da relação entre etileno e auxina durante o processo de abscisão que resulta na ocorrência do degrane.

Os outros três possíveis genes relacionados ao degrane detectados através do mapa de haplótipos, Os03g0745400, Os08g0512400 e Os11g0148700 foram expressos aos dez dias após a polinização na região entre o pedicelo e a flor. Entretanto, estes três genes não se mostraram relacionados com o nível de degrane e apresentaram o mesmo padrão de expressão, onde a expressão relativa do ecótipo de arroz vermelho AV 31 e das cultivares de arroz foi semelhante entre si e inferior em comparação ao controle AV 60 (Figura 11). O fato destes genes não apresentarem uma relação entre a sua expressão e o nível de degrane nos genótipos avaliados poderia estar associado à possibilidade destes genótipos apresentarem níveis de degrane muito menor que os genótipos do trabalho que os descrevem. Salienta-se que a determinação do degrane no trabalho do mapa de haplótipos foi feita de forma qualitativa, já a fenotipagem dos genótipos avaliados neste trabalho foi feita de forma quantitativa.

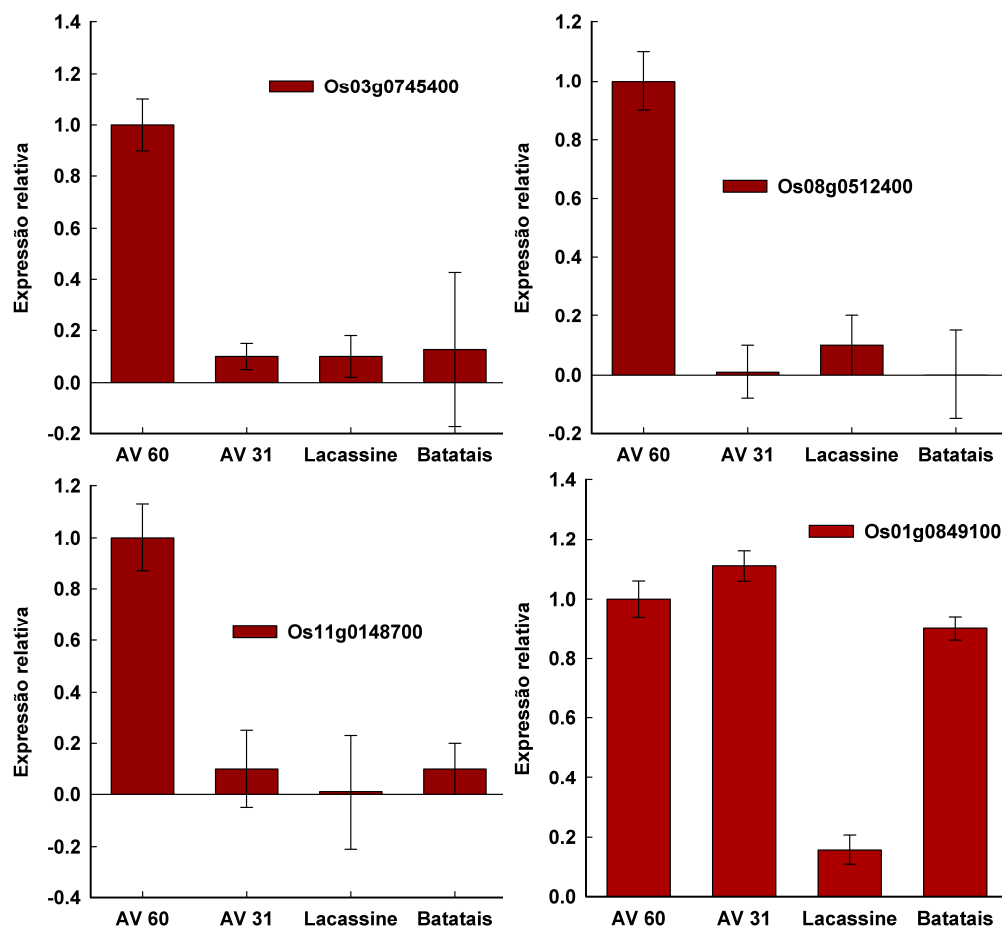


FIGURA 11. Expressão relativa de genes com possível ação sobre o degrane na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização.

As informações sobre o produto oriundo da expressão do gene Os03g0745400 são desconhecidas. Já o gene Os08g0512400 codifica uma proteína com um domínio de ligação ao DNA do tipo *HMG-I/Y* (*High mobility group*) (Reeves & Beckerbauer, 2001). Estas proteínas possuem baixo peso molecular, não histonas com ação na cromatina. Dessa forma, as proteínas desta família modulam a estrutura do DNA alterando a transcrição de genes facilitando ou impedindo a ligação de fatores de transcrição (Ziólkowski *et al.*, 2009). Segundo o banco de dados do NCBI, o gene Os11g0148700 codifica proteínas dedo de zinco do tipo PHD. Este tipo de domínio protéico tem como

propriedade mais conhecida a de se ligar ao DNA e modular a expressão de genes. Sabe-se que este tipo de proteína pode mediar interações entre proteínas e entre proteínas e lipídios (Matthews & Sunde, 2002). Assim, os genes Os08g0512400 e Os11g0148700 poderiam estar associados à presença ou ausência de degrane de uma forma indireta regulando a expressão de outros genes e até enzimas que possam estar associados ao degrane.

Por fim, o gene Os01g0849100 posicionado a 34kb *upstream* ao gene *qSH1* apresentou expressão na região entre o pedicelo e a flor. Entretanto, este gene não está diretamente relacionado com o nível de degrane, pois a expressão relativa do ecótipo de arroz vermelho AV 31 e a cultivar Batatais foi semelhante ao ecótipo controle, enquanto que a cultivar Lacassine apresentou uma expressão relativa de 0,2 (Figura 11). O gene Os01g0849100 codifica uma proteína com um domínio que estimula a troca de nucleosídeos difosfatados por nucleosídeos trifosfatados (Berken *et al.*, 2005).

4.3 Variabilidade nucleotídica de genes relacionados ao degrane e parede celular

4.3.1 Genes com efeito comprovado sobre o degrane

Atualmente, existem três genes com efeito comprovado sobre o degrane, *qSH1*, *Sh4* e *OsCPL1*. O SNP do gene *Sh4* não foi passível de amplificação provavelmente devido estar presente numa região rica em GC. Diversas tentativas foram realizadas no sentido da obtenção da amplificação deste gene. Inicialmente, foram utilizados nove pares de *primers* (Apêndice 1) utilizando a configuração padrão das reações de PCR utilizadas neste trabalho. Após, com esse conjunto de pares de *primers* foram feitas reações de PCR em

termociclador com gradiente de temperatura de pareamento com o objetivo de otimizar esta variável. Também foram realizadas reações de PCR convencional e em termociclador com gradiente de temperatura com variações nas concentrações e quantidades dos componentes da reação. Além disso, o conjunto de *primers* foi utilizado para a amplificação do cDNA de *Sh4* utilizado nas reações de PCR em tempo real. Nenhuma das tentativas acima resultou na amplificação do gene *Sh4*.

Para o gene *qSH1*, a substituição do nucleotídeo G por T na região regulatória 5' deste gene, a 11841 bases *upstream* causa a ausência do degrane (Konishi *et al.*, 2006). Entretanto, a variabilidade nucleotídica dos ecótipos de arroz vermelho e das cultivares de arroz avaliados mostrou, com exceção da cultivar Nipponbare, que na posição 11841 bases *upstream* do gene *qSH1* (Apêndice 2) a base presente era G (Figura 12). Cabe lembrar que o trabalho que verificou a mutação a 11841 bases *upstream* utilizou ecótipos oriundos da subespécie japônica. Duas cultivares de arroz da subespécie japônica foram utilizados na determinação da variabilidade fenotípica e de nucleotídeos realizadas, Wells e Nipponbare. No Brasil, a subespécie de arroz japônica é pouco cultivada e estas cultivares de arroz da subespécie japônica foram utilizados como controles. Nipponbare e Wells apresentaram, na posição 11841 bases *upstream* do gene *qSH1*, os nucleotídeos T e G, respectivamente. A apresentação destes nucleotídeos corresponde com a fenotipagem realizada, pois a RTR das cultivares Nipponbare e Wells foi de 270 e 105 gf, respectivamente. O esperado era que a cultivar Wells apresentasse uma maior RTR, pois a subespécie japônica apresenta um menor nível de degrane em comparação a subespécie índica (Delouche *et al.*, 2007). Além disso, era

esperado que a cultivar Wells apresentasse na posição 11841 bases *upstream* do gene *qSH1* o nucleotídeo T. O fato de apresentar o nucleotídeo G nesta posição explica o menor valor de RTR encontrado. A origem da presença deste nucleotídeo pode estar associado à genealogia da cultivar Wells que possui como parentais as cultivares da subespécie índica Labelle, Newbonnet e Lebonnet (Moldenhauer, 2001). Situação semelhante foi encontrada durante a avaliação da diversidade molecular do gene *qSH1* em que dois genótipos da subespécies japônica apresentaram o nucleotídeo G e presença do degrane (Zhang *et al.*, 2009).

	11820	11830	11840	11850	11860
Modelo sem degrane	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Modelo com degrane	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Glumaepatula	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 60	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 172	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 04B	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 109	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 53	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
ITJ 03	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 223	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
ITJ 01	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 04A	ATGGTATTGA	TG~ATACTGG	ACATTGC~TG	ATACAC~TAC	CACCAAATGC
AV 73	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
ITJ 11	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 133	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 98	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 144	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Sator CL	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Puitá INTA CL	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
IRGA 417	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
IRGA 422 CL	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 182	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
IRGA 424	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Cypress	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
AV 31	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Blue Belle	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Wells	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Lacassine	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
CICA 8	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Epagri 109	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Fanny	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
EEl 23	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
EEl 31	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Kaybonnet	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Glaberrima	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
EMPASC 100	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Batatais	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC
Nipponbare	ATGGTATTGA	TGTATACTGG	ACATTGCATG	ATACACGTAC	CACCAAATGC

FIGURA 12. Alinhamento parcial das sequências a aproximadamente 11 kb *upstream* do gene *qSH1* em 36 genótipos de arroz. Fita senso.

Dessa forma, para os genótipos avaliados neste trabalho, o gene *qSH1* não está relacionado de forma direta com a presença do degrane. Resultados

semelhantes foram encontrados em 58 amostras de arroz daninho proveniente de lavouras do sul dos Estados Unidos. Em todos os ecótipos avaliados foi encontrado o nucleotídeo G na posição 11841 bases *upstream* do gene *qSH1*, que é o SNP ancestral presente na espécie silvestre *O. rufipogon* (Thurber *et al.*, 2010). Entretanto, a correlação entre o gene *qSH1* e a estrutura do pedicelo em ecótipos de arroz vermelho com elevado grau de parentesco com cultivares de arroz da subespécie japônica mostrou que o hábito da debulha natural nestes ecótipos é produto de efeitos genéticos múltiplos, causados pela substituição do nucleotídeo T pelo G na posição 11841 bases *upstream* do gene *qSH1* e por genes não identificados que causam a formação completa da camada de abscisão (Akasaka *et al.*, 2011). Por fim, análises de diversidade molecular do gene *qSH1* em genótipos das subespécies japônica e índica e das espécies silvestres *O. nivara* e *O. rufipogon* concluíram que a seleção do gene *qSH1* na subespécie índica não foi detectada (Zhang *et al.*, 2009). Portanto, a mutação da região regulatória 5' do gene *qSH1* parece estar presente nos genótipos que tenham como *background* genético a subespécie japônica.

O outro gene avaliado em relação à ocorrência de SNPs relacionados ao degrane foi o *OsCPL1*. A sequência nucleotídica deste, depositada no *GeneBank* possui aproximadamente 6550 bases e apresenta oito exons. Para este gene, foi sequenciada uma região do exon número seis e uma região entre o intron sete e o exon oito (Apêndice 4). No exon seis são esperadas três possíveis mutações numa região composta por 55 bases (Ji *et al.*, 2010) (Figura 13). Entretanto, nenhum dos 36 genótipos avaliados apresentou alguma alteração da constituição nucleotídica destas regiões. Ao contrário

disso, foram encontrados algumas mutações ao acaso nos ecótipos de arroz vermelho AV 04B, ITJ 3 e ITJ 11. Já no fim do intron sete, era esperado um SNP (A para T) na posição 5498 do gene que causa uma deleção de 15 pares de bases no mRNA em função de um *splicing* alterado, fazendo com que o fenótipo apresente degrane (Ji *et al.*, 2010). Entretanto, nenhum genótipo avaliado apresentou o SNP esperado (Figura 14). Este SNP foi localizado em um mutante de arroz cultivado e se comporta como um gene recessivo (Ji *et al.*, 2010). O fato do degrane ser uma característica não desejada em cultivares de arroz e do gene se comportar de forma recessiva, faz com que a sua seleção seja quase improvável, possuindo assim menores chances de serem encontrados em arroz vermelho em condições naturais.

	3506	3516	3526	3536	3546	
Modelo - Hwacheong- s/ degrane	GATCTGAATC	CACTA CC AT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATA G
Modelo - Hsh - c/ degrane	GATCTGAATC	CACTA CC AT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATA G
Glumaepatula	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 60	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 172	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 04B	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGAT C	CATAC
AV 109	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 53	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
ITJ 03	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGAT C	CATAC
AV 223	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
ITJ 01	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 04A	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 73	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Wells	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 133	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 98	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 144	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Sator CL	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Puitá INTA CL	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
IRGA 417	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
IRGA 422 CL	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 182	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
IRGA 424	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Cypress	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
AV 31	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Blue Belle	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
ITJ 11	GATCTGA AT C	CACTAGCCAT	GCAGTTA AG A	CTTGTGTTGG	GAGCGAT CA C	CATAC
Lacassine	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
CICA 8	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Epagri 109	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Fanny	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
EEl 23	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
EEl 31	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Kaybonnet	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Glaberrima	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
EMPASC 100	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Batatais	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
Nipponbare	GATCTGAATC	CACTAGCCAT	GCAGTTAAGA	CTTGTGTTGG	GAGCGATCAC	CATAC
**.**

FIGURA 13. Alinhamento parcial das sequências do exon 6 do gene *OscPL1* em 36 genótipos de arroz. SNPs 1, 2 e 3. Fita senso.

	5485	5495	5505	5515	5525
Modelo-Hwacheong-sem degrane	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Modelo-Hsh-com degrane	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Glumaepatula	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 60	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 172	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 04B	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 109	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 53	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
ITJ 03	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 223	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
ITJ 01	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 04A	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 73	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
ITJ 11	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 133	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 98	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 144	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Sator CL	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Puitá INTA CL	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
IRGA 417	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
IRGA 422 CL	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 182	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
IRGA 424	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Cypress	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
AV 31	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Blue Belle	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Wells	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Lacassine	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
CICA 8	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Epagri 109	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Fanny	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
EEl 23	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
EEl 31	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Kaybonnet	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Glaberrima	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
EMPASC 100	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Batatais	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA
Nipponbare	ACTGATGTCC	TGCTTACAGG	CTTTTGGATT	CCAGTTAGAC	AATGGCA

FIGURA 14. Alinhamento parcial das sequências entre o intron sete e o exon 8 do gene *OsCPL1* em 36 genótipos de arroz. SNP 4. Fita Senso.

4.3.2 Genes relacionados à parede celular

O gene *OsXTH8* codifica uma enzima *xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase* que está relacionada com a clivagem de polímeros na parede celular (Rose *et al.*, 2002). Os genótipos de arroz vermelho apresentaram maiores níveis de expressão em relação às cultivares de arroz. Como não foram encontrados na literatura trabalhos relacionados à SNPs neste gene, foram alinhadas as sequências padrões das subespécies japônica e índica proveniente dos banco de dados *Gramene* para verificar a

presença de possíveis SNPs. Foram encontrados três possíveis SNPs neste gene nas posições 540, 617 e 765 (Apêndice 5).

Dos três possíveis SNPs, somente o SNP da posição 765 pares de bases era de interesse, pois a mutação da posição 540 está presente no intron um e a mutação da posição 617 é uma mutação nula. Entretanto, os resultados do sequenciamento deste gene nos genótipos avaliados neste estudo demonstraram apenas mutações no intron um (Figura 15).

	530	540	550	560
Modelo Japonica	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Modelo Indica	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Kaybonnet	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Lacassine	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
IRGA 422 CL	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
ITJ 01	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Batatais	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
IRGA 424	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 31	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Cypress	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 182	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 53	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 98	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 109	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 133	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 172	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 223	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Cica 8	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
EEl 31	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 60	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 04A	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 73	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 04B	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
AV 144	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
ITJ 11	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Puita INTA CL	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Sator CL	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
EEl 23	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Empasc 100	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Epagri 109	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
ITJ 03	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
IRGA 417	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Blue belle	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Glaberrima	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Glumaepatula	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Fanny	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Nipponbare	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
Wells	TCAAACAATC	ATCGCGTTAA	TTTGCTGAAT	TACGATTACT
****

FIGURA 15. Alinhamento parcial das sequências do intron 1 do gene *OsXTH8* em 36 genótipos de arroz. Fita senso.

Na posição 540, a maioria dos genótipos apresentaram o nucleotídeo citosina. Somente os genótipos Blue belle, Glaberrima, Glumaepatula, Fanny, Nipponbare e Wells apresentaram o nucleotídeo T nesta posição. Já na posição 530 do gene, foi detectada uma mutação que não era esperada. Por se tratar de uma mutação em um intron e longe dos limites entre o intron e os exons, é pouco provável que esta mutação esteja relacionada a um *splicing* alterado. De qualquer forma, não há uma relação entre a mutação encontrada na posição 530 e o nível de degrane, pois a mutação está presente tanto em genótipos com degrane quanto em genótipos sem degrane. Além disso, não há uma relação entre esta mutação e a expressão deste gene, pois o genótipo AV 31 que possui níveis maiores de expressão (Figura 10) e degrane (Figura 5) que as cultivares Lacassine e Batatais apresentam a mesma mutação.

4.3.3 Genes com possível ação sobre o degrane

Os genes com possível ação sobre o degrane avaliados em relação ao seu nível de expressão no item 4.2.3 tiveram também a sua variação nucleotídica determinada. Dos seis genes selecionados a partir do mapa de haplótipos (Huang *et al.*, 2010), Os02g0613200 (Figura 16), Os03g0745400 (Figura 17) e Os11g0148700 (Figura 18) não apresentaram os SNPs citados no estudo original em nenhum dos 36 genótipos analisados.

	6760	6770	6780	6790
Modelo	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Glumaepatula	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 60	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 172	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 04B	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 109	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 53	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
ITJ 03	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 223	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
ITJ 01	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 04A	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 73	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
ITJ 11	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 133	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 98	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 144	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Sator CL	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Puitá INTA CL	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
IRGA 417	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
IRGA 422 CL	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 182	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
IRGA 424	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Cypress	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
AV 31	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Blue Belle	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Wells	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Lacassine	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
CICA 8	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Epagri 109	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Fanny	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
EEI 23	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
EEI 31	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Kaybonnet	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Glaberrima	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
EMPASC 100	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Batatais	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG
Nipponbare	TCTCGCTGAA	CGTCTCCAAC	ACTCGTGTAT	CCAATGCCGG

FIGURA 16. Alinhamento parcial das sequências do exon 15, do gene Os02g0613200 em 36 genótipos de arroz. SNP esperado na posição 6782 da fita anti-senso.

	3075	3085	3095	3105
Modelo	TCCACCTACT	ATTTTCTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Glumaepatula	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 60	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 172	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 04B	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 109	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 53	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
ITJ 03	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 223	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
ITJ 01	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 04A	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 73	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
ITJ 11	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 133	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 98	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 144	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Sator CL	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Puitá INTA CL	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
IRGA 417	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
IRGA 422 CL	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 182	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
IRGA 424	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Cypress	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
AV 31	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Blue Belle	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Wells	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Lacassine	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
CICA 8	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Epagri 109	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Fanny	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
EEI 23	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
EEI 31	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Kaybonnet	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Glaberrima	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
EMPASC 100	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Batatais	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG
Nipponbare	TCCACCTACT	ATTTTACTAT	CCTCTTTTAT	GTTTAAGATG

FIGURA 17. Alinhamento parcial das sequências do intron 5, do gene Os03g0745400 em 36 genótipos de arroz. SNP esperado na posição 3086 da fita senso.

	6471	6481	6491	6501	6511
Modelo	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Glumaeapatula	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 60	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 172	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 04B	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 109	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 53	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
ITJ 03	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 223	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
ITJ 01	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 04A	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 73	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
ITJ 11	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 133	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 98	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 144	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Sator CL	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Puitá INTA CL	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
IRGA 417	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
IRGA 422 CL	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 182	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
IRGA 424	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Cypress	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
AV 31	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Blue Belle	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Wells	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Lacassine	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
CICA 8	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Epagri 109	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Fanny	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
EEl 23	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
EEl 31	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Kaybonnet	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Glaberrima	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
EMPASC 100	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Batatais	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT
Nipponbare	GTTATGTATA	TATATATATG	TGTGTGTTAT	CTATCAGATT	TTAACTTCTT

FIGURA 18. Alinhamento parcial das sequências do gene Os11g0148700 em 36 genótipos de arroz. SNP esperado na posição 6486 da fita reversa.

Os genes Os05g0117300 e a região regulatória do gene Os10g0137700 apresentaram poucos genótipos com os SNPs esperados. Dos 29 genótipos que apresentaram cromatogramas de qualidade para o gene Os05g0117300, apenas quatro apresentaram mutações na posição 804 do gene (Figura 19). Apesar da técnica da construção do mapa de haplótipos detectar este SNP como funcional para o degrane, na prática provavelmente este SNP não seja funcional. Mutações em introns como nesse caso só têm efeito sobre a proteína quando o SNP está localizado próximo ao limite entre o intron e os exons, podendo gerar um processamento diferenciado do mRNA (Schuler, 2008). Para o gene Os10g0137700, dos 28 genótipos que apresentaram

cromatogramas de qualidade, apenas três apresentaram a mutação na posição 98 da região regulatória *upstream* do gene (Figura 20).

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ...
      790      800      810      820
Modelo  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 60   TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 109  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 182  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATCTCGATC T~A
Epagri 109
AV 04A  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 73   TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 98   TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 133  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 144  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 172  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 223  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
Batatais
Cica 8  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC T~A
EEI 23  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
EEI 31  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
Empasc 100
Fanny   TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
Glaberrima
Glumaepatula
IRGA 417  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
IRGA 422 CL
IRGA 424  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
ITJ 01   TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
Puita INTA CL
Wells   TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 04B  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
Lacassine
Sator CL  TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
AV 53   TTGATGTCAT ATATATTG C TTGCATGATA AATATCGATC TCA
      .....*.....

```

FIGURA 19. Alinhamento parcial das sequências do intron 1, do gene Os05g0117300 em 29 genótipos de arroz. SNP esperado na posição 804 da fita senso.

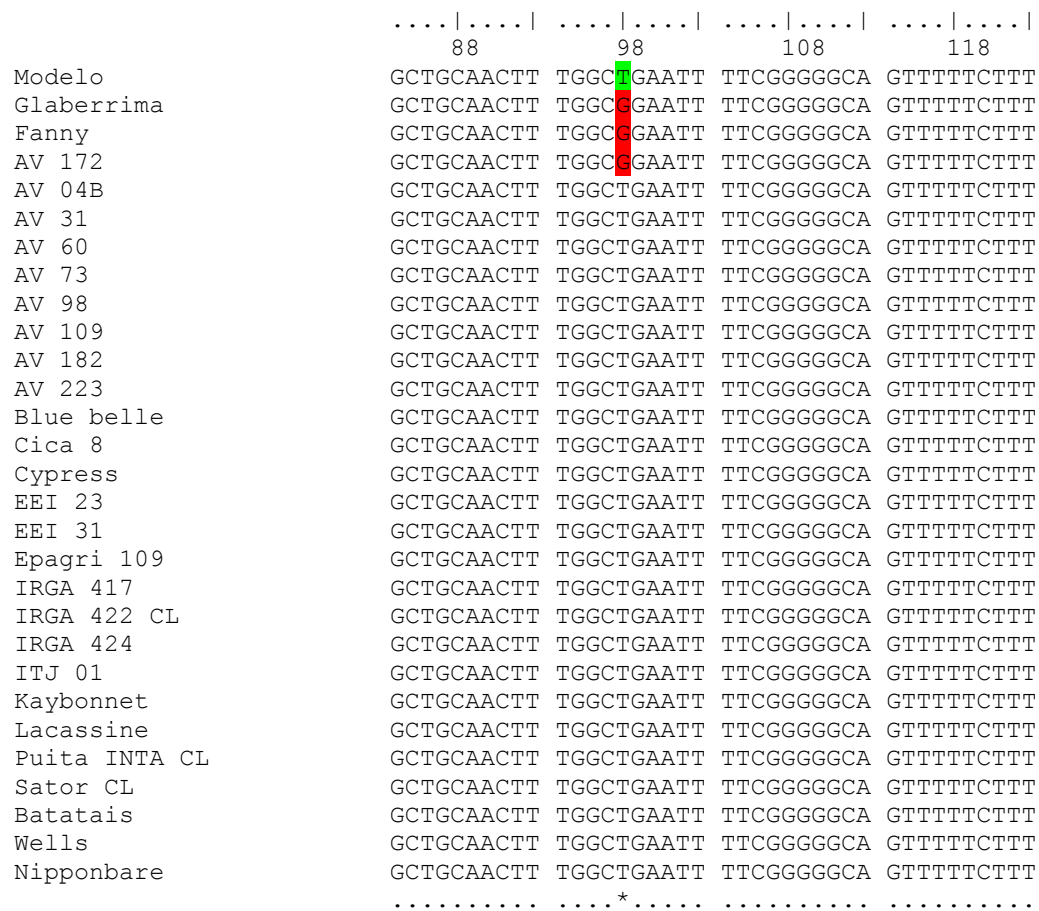


FIGURA 20. Alinhamento parcial das sequências a 98 bases *upstream* do gene Os10g0137700 em 28 genótipos de arroz. Fita senso.

O alinhamento parcial das sequências a 1271 bases *upstream* do gene Os08g0512400 em 31 genótipos de arroz (Figura 21) mostrou resultados que podem apresentar relação entre a presença de SNPs e a mudança no fenótipo. Na região regulatória 5' do gene Os08g0512400 os genótipos que apresentam o nucleotídeo T na posição 1271 *upstream* do gene tendem a apresentar elevado degrane, enquanto que os genótipos que apresentam o nucleotídeo A tendem a apresentar baixo degrane (Figura 22). A única exceção a esta associação é o genótipo de arroz vermelho AV 109.

O SNP presente na região regulatória deste gene não é o único responsável pela presença ou ausência do degrane nos genótipos utilizados, pois somente a presença de outros genes relacionados a esta característica explica a diferença do nível de degrane dentro de um grupo que possui o mesmo nucleotídeo na posição 1271. Outra possibilidade dessa teoria é que os genótipos que estão na zona de transição entre o fim do grupo com alto degrane e o início do grupo com médio degrane possuem níveis de degrane semelhante e possuem nucleotídeos diferentes. Entre a cultivar Puitá INTA CL e o arroz vermelho AV 31 a diferença da RTR é de apenas 20 g. Apesar da quantificação do degrane através da RTR ser de forma quantitativa a separação dos grupos do nível de degrane (alto, médio e baixo) é de certa forma subjetiva, o que permite as diferenças apresentadas nas zonas de transição.

Os genótipos AV 04A, IRGA 422, Kaybonnet, Blue belle e EEI 31 não apresentaram cromatogramas confiáveis em relação à região regulatória do gene Os08g0512400 e foram descartados da análise. Os genótipos de arroz vermelho AV 172 e ITJ 01 ficaram de fora da análise acima, devido ao fato de que na avaliação da fenotipagem da safra 2010/11 os mesmos apresentaram médio degrane (Figura 6), mas em avaliação anterior na safra 2008/09 estes apresentaram elevado degrane (Figura 5). Outra exceção é o genótipo de *O. glaberrima* que possui baixo degrane, mas possui o nucleotídeo T que estaria condicionado ao elevado degrane. Entretanto, cabe lembrar que *O. glaberrima* e *O. glumaepatula* são de espécies diferentes dos demais genótipos avaliados, pois o arroz vermelho e o arroz cultivado pertencem a espécie *O. sativa*. Dessa forma, estes dois genótipos não podem ser

considerados na inferência sobre a relação entre a presença dos SNPs e a mudança no fenótipo em arroz vermelho e arroz cultivado.

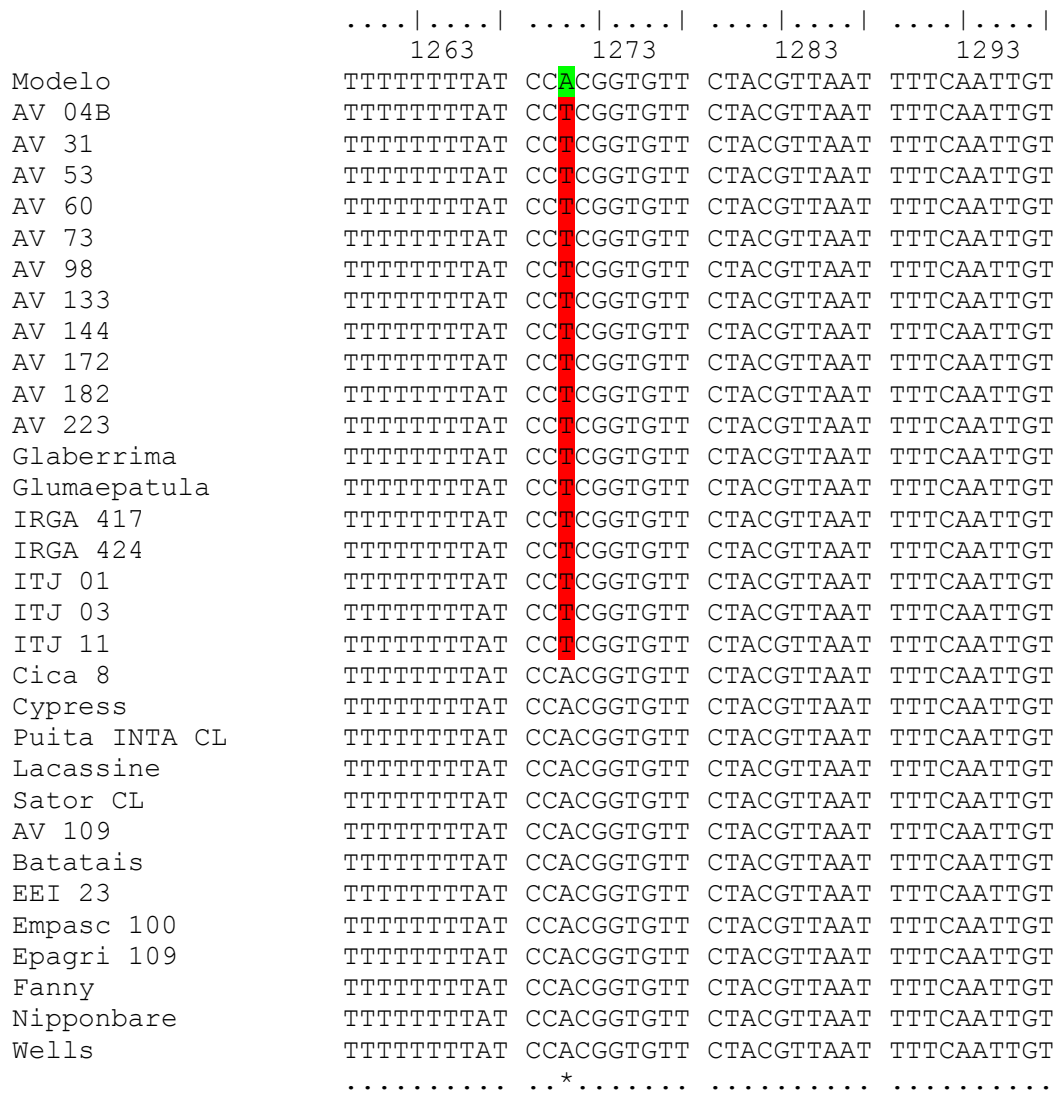


FIGURA 21. Alinhamento parcial das sequências a 1271 bases *upstream* do gene Os08g0512400 em 31 genótipos de arroz. Fita senso.

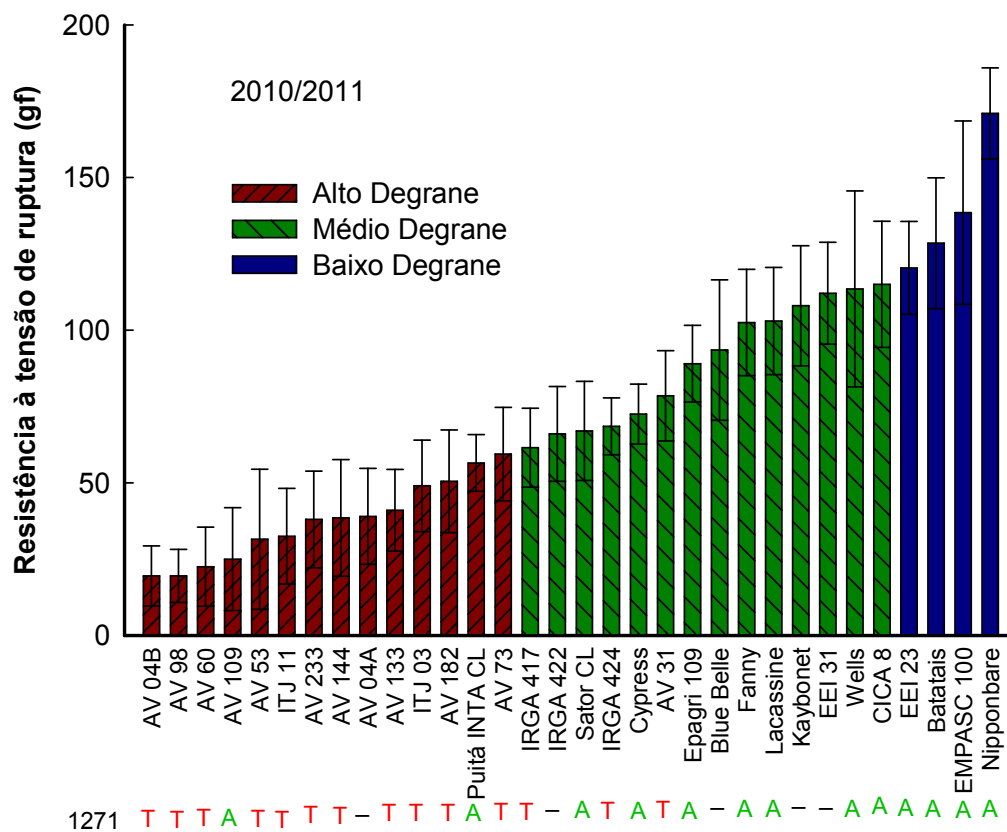


FIGURA 22. Relação entre o nível da Resistência à retenção de ruptura (RTR) e o nucleotídeo presente a 1271 bases *upstream* do gene Os08g0512400. T = Timina, A = Adenina, - = informação não disponível.

A variação nucleotídica do exon 5 do gene Os01g0849100 apresentou dois SNPs, nas posições 2981 e 3057, que podem estar relacionados ao degrane em arroz (Figura 23). Na posição 2981 a mutação de G para A altera a formação de uma arginina para uma histidina na posição 994 da proteína. Já na posição 3057 do gene a alteração de uma T para uma G resulta na alteração de uma histidina para uma glutamina na posição 1019 da proteína. De uma forma geral, os genótipos que possuem nas posições 2981 e 3057 os nucleotídeos G e T, respectivamente, possuem elevado degrane. Os genótipos que possuem médio degrane possuem os nucleotídeos A e T nas posições

citadas. Por fim, os genótipos que possuem os nucleotídeos G e G nas posições 2981 e 3057, respectivamente, tendem a possuir menor degrane (Figura 24). Ao interpretar a Figura 24 deve ser considerado que a formação dos grupos dos níveis de degrane ocorreu de forma subjetiva. Dessa forma, se verifica que nas zonas de transição entre os grupos existem genótipos com o lócus do gene que propicia o degrane elevado agrupados no grupo “médio degrane”, por exemplo. Assim, somente os genótipos Sator CL e EEI 23 são exceções a este comportamento. Sator CL possui o genótipo de baixo degrane, mas o fenótipo apresentado é de alto degrane do degrane. Já o genótipo EEI 23 possui comportamento contrário, ou seja, apresenta genótipo de alto degrane, mas o fenótipo de baixo degrane. Ao analisar a relação do SNP da região regulatória 5’ do gene Os08g0512400 com o nível de degrane concluiu-se que há outros genes atuando sobre o fenótipo do degrane, e a variação nucleotídica do gene Os01g0849100 o torna um possível candidato.

	
	2985	2995	3005	3015	3025	3035	3045	3055
Mod. Nipponbare	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Mod. Kasalah	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 04A	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 31	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 53	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 60	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 144	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 172	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 182	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 223	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
ITJ 01	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
ITJ 03	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
ITJ 11	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
EEI 23	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Glaberrima	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 133	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
IRGA 417	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
AV 98	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
IRGA 422 CL	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
IRGA 424	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
CICA 8	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Lacassine	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Epagri 109	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Puitá INTA CL	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Kaybonnet	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Fanny	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Batatais	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Wells	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Blue Belle	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Empasc 100	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Glumaepatula	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Nipponbare	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC
Sator CL	CGTGATGAGA	AATGGTGGTT	GCCGGTGCCT	CGTGTTCCCTC	CCGGAGGCCT	GCGTGACAAA	GCGAGGAAGC	AACTGCATC

FIGURA 23. Alinhamento parcial das sequências do exon 5 do gene Os01g0849100 em 32 genótipos de arroz. Fita reversa.

Para a análise acima, os genótipos AV 04B, AV 73, AV 109, Cypress e EEI 31 não produziram cromatogramas de qualidade e foram descartados. Já os genótipos de arroz vermelho AV 172 e ITJ 01 e as espécies *O. glaberrima* e *O. glumaepatula* não participaram da análise pelos mesmos motivos apresentados ao analisar a relação do SNP da região regulatória 5' do gene Os08g0512400 com o degrane.

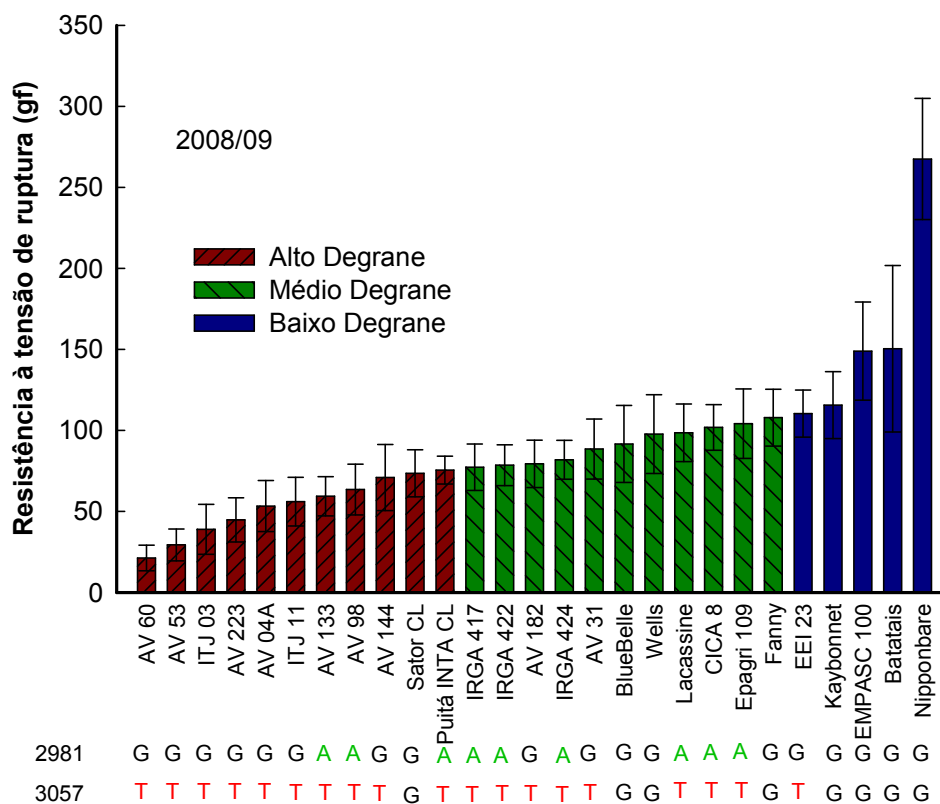


FIGURA 24. Relação entre o nível da Resistência à retenção de ruptura (RTR) e os nucleotídeos presentes nas posições 2981 e 3057 do gene *Os01g0849100*. T = Timina, A = Adenina, G = Guanina.

4.4 Identificação de novos genes relacionados ao degrane através da técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH)

A técnica de subtração foi realizada no sentido direto e reverso. No sentido direto foi criada a biblioteca PD (presença de degrane) e a população *driver* foi usada com um excesso dos cDNAs sintetizados a partir da resposta da ausência de degrane (Batatais) e a população *tester* provinha da resposta de presença de degrane (AV 60). Nesse caso, se esperava isolar sequências somente expressas, ou com expressão aumentada, na presença de degrane.

Contrariamente, no sentido reverso foi criada a biblioteca AD (ausência de degrane) e a população *driver* continha os cDNAs sintetizados a partir da presença de degrane (AV 60) e a população *tester* provinha da resposta de ausência de degrane (Batatais). E assim, neste caso, se esperava isolar sequências que quando expressas estejam relacionadas à ausência de degrane. A identificação de clones em ambos os sentidos permite identificar genes comuns com expressão diferencial entre as duas bibliotecas.

A ligação dos cDNA-SSH no vetor gerou 259 e 108 clones na biblioteca PD e AD, respectivamente. Após a análise de inserção por PCR e sequenciamento do DNA, verificou-se que 103 e 51 clones apresentaram insertos na biblioteca PD e AD, respectivamente. O sequenciamento destes clones originou sequências nucleotídicas que após o procedimento de busca na base de dados do *GeneBank* resultou nos genes descritos na Tabela 11.

TABELA 11. Análise da similaridade dos clones sequenciados e isolados na técnica de SSH na presença e ausência de degrane

Categorias	Gene	Descrição	Biblioteca		Total Escore	E-value	Query coverage	Max ident	r
			PD	AD					
Grupo I – Processamento e armazenamento da informação									
Dinâmica e estrutura da cromatina	Os03g0162200	Similar to Histone H2A	1	0	7252	2e-05	77	100	1
Dinâmica e estrutura da cromatina	Os04g0419600	Histone H3.	2	0	5252	2e-05	47	95	2
Processamento e modificação de RNA	Os08g0288500	D111/G-patch domain containing protein	1	0	30,1	0,97	82	94	1
Transcrição	Os04g0580700	MADS box transcription factor MADS17.	1	0	1022	0,00365	67	94	1
Transcrição	Os08g0433400	Similar to Transcription repressor MYB4	1	0	103	0,085	49	100	1
Transcrição	Os09g0455200	Winged helix repressor DNA-binding domain containing protein.	2	0	5567	2e-05	99	100	2
Transcrição	Os09g0507200	MADS box protein	1	0	354	0,096	88	98	1
Translação, estrutura ribossomal e biogêneses	Os04g0627900	Translation initiation factor SUI1 domain containing protein.	1	0	850	0,068	85+	86	1
Translação, estrutura ribossomal e biogêneses/transcrição	Os07g0103600	Armadillo-like helical domain containing protein	2	0	7764	0,0002	97	95	2
Translação, estrutura ribossomal e biogêneses/transcrição	Os09g0116400	Armadillo-like helical domain containing protein	2	0	144	0,51	31	86	2
Subtotal			14	0					14
Grupo II – Sinalização e processos celulares									
Biogênese de parede, membrana e envelope celular / estruturas extracelulares	Os09g0248100	Beta-Ig-H3/fasciclin domain containing protein	0	3	5633	5e-6	52	100	3
Mecanismos de transdução de sinais	Os02g0176100	Wilm's tumour protein family protein	1	0	171	0,055	14	100	1

continuação TABELA 11. Análise da similaridade dos clones sequenciados e isolados na técnica de SSH na presença e ausência de degrane

Mecanismos de transdução de sinais	Os08g0133201	Copines	2	0	131	2,2	22	95	2
Mecanismos de transdução de sinais	Os10g0155800	Protein kinase-like domain containing protein	1	0	101	0,19	37	100	1
Mecanismos de transdução de sinais	Os07g0550400	Receptor-like protein kinase 5.	0	1	770	0,078	93	100	1
Mitose e controle do ciclo celular	Os10g0495600	Similar to DNA-directed RNA polymerase I polypeptide 2	3	1	150	0,002	78	100	4
Mitose e controle do ciclo celular	Os11g0415400	Conserved hypothetical protein	1	2	131	0,011	90	100	3
Mitose e controle do ciclo celular / Modificação pós-translacional, proteína <i>turnover</i> , função chaperonas	Os02g0700100	Similar to WD-repeat protein.	2	0	1431	0,0055	84	100	2
Modificação pós-translacional, proteína <i>turnover</i> , função chaperonas	Os04g0670800	UAS domain containing protein	1	0	36	0,4	40	84	1
Modificação pós-translacional, proteína <i>turnover</i> , função chaperonas	Os05g0418000	GDP dissociation inhibitor protein OsGDI1	2	0	124	0,32	54	100	2
Modificação pós-translacional, proteína <i>turnover</i> , função chaperonas	Os01g0971400	Similar to Cysteine proteinase.	2	0	6834	2e-05	87	100	2
Modificação pós-translacional, proteína <i>turnover</i> , função chaperonas	Os06g0693100	Disease resistance protein family protein	1	0	4897	2e-05	64	88	1
Subtotal			15	4					19

continuação TABELA 11. Análise da similaridade dos clones sequenciados e isolados na técnica de SSH na presença e ausência de degrane

Grupo III – Metabolismo									
Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo	Os11g0416900	ABC transporter related domain containing protein	1	0	190	0,019	86	100	1
Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo / metabolismo e transporte de lipídios	Os01g0183600	Cytochrome P450 family protein	17	1	231	0,001	92	100	18
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os11g0184200	Glycoside hydrolase, family 1 protein	3	0	5733	5e-6	75	100	3
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os02g0650900	Similar to Glutamate dehydrogenase 2	1	0	4381	3e-04	70	100	1
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os03g0106400	Similar to Branched-chain-amino-acid aminotransferase 5, chloroplast precursor	1	0	3589	2e-05	90	100	1
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os08g0127100	Amino acid transporter, transmembrane family protein.	1	0	4651	2e-04	95	100	1
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os12g0194900	Similar to Amino acid carrier	0	1	6106	7e-05	69	100	1
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os12g0578200	Similar to Chorismate mutase, chloroplast precursor	0	1	4106	8e-05	85	100	1
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os01g0112400	Major intrinsic protein family protein.	1	0	6845	2e-6	51	100	1
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os03g0703100	Similar to Beta-glucosidase.	2	0	5733	5e-5	75	100	2
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os01g0264100	Similar to UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0	1	7932	2e-05	86	100	1
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os03g0184300	Glycosyl transferase, family 8 protein.	0	1	2985	7e-05	48	95	1
Transporte e metabolismo de carboidratos	Os09g0433000	Glycosyl transferase, family 31 protein.	0	1	6101	7e-05	84	95	1
Transporte e metabolismo de lipídios	Os08g0554100	Similar to MYST1 protein	2	0	120000	0,0005	100	100	2

continuação TABELA 11. Análise da similaridade dos clones sequenciados e isolados na técnica de SSH na presença e ausência de degrane

Transporte e metabolismo de lipídios	Os02g0814200	Similar to CER1-like gene protein (Fragment)	4	0	3381	2e-05	90	95	4
Transporte e metabolismo de lipídios	Os02g0590400	Lecithin:cholesterol acyltransferase family protein.	0	1	3547	7e-05	46	100	1
Transporte e metabolismo de lipídios / Biosíntese de metabolitos secundários, transporte e catabolismo	Os08g0472800	Cytochrome P450 family protein.	3	0	7854	3e-07	100	100	3
Subtotal			3	1					4
Grupo IV – Pouco caracterizados									
Função não conhecida	Os03g0581600	Similar to Plastid protein	1	0	231	0,001	92	100	1
Função não conhecida	Os05g0256350	Zinc finger, BED-type predicted domain containing protein	1	0	144	0,008	31	100	1
Função não conhecida	Os08g0494200	Conserved hypothetical protein	1	0	31	5,1	26	90	1
Função não conhecida	Os08g0536400	Conserved hypothetical protein	0	2	452	0,068	70	90	2
Função não conhecida	Os09g0248000	Protein of unknown function DUF516 family protein	0	1	3847	4e-7	82	100	1
Função não conhecida	Os09g0248200	Frigida-like family protein	0	1	6845	2e-6	51	100	1
Função não conhecida	Os11g0532200	Hypothetical protein	2	0	60	0,28	83	95	2
Função não conhecida	Os12g0548800	Conserved hypothetical protein	1	0	73	1,5	7	92	1
Função não conhecida	Os12g0588100	Conserved hypothetical protein	1	0	123	0,011	85	100	1
Função não conhecida	Os01g0954100	Conserved hypothetical protein.	1	0	2301	0,0001	92	100	1
Função não conhecida	Os02g0288600	BURP domain containing protein.	1	0	20000	0,0045	100	100	1
Função não conhecida	Os02g0289000	Conserved hypothetical protein.	1	0	5733	5e-6	85	100	1
Função não conhecida	Os02g0733300	Similar to Endo-beta-1,4-glucanase precursor	2	0	890	0,0019	86	100	2
Função não conhecida	Os03g0243700	Glycoside hydrolase, family 10 protein.	3	0	3387	3e-04	80	100	3
Função não conhecida	Os03g0244600	Similar to AUX1-like protein.	2	0	424	0,032	77	100	2
Função não conhecida	Os03g0793800	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor domain containing protein.	1	0	301	0,019	57	100	1

continuação TABELA 11. Análise da similaridade dos clones sequenciados e isolados na técnica de SSH na presença e ausência de degrane

Função não conhecida	Os03g0612400	Similar to LATERAL ORGAN BOUNDARIES protein.	1	0	131	2,1	32	95	1
Função não conhecida	Os03g0672400	Conserved hypothetical protein.	1	0	4432	5e-6	72	100	1
Função não conhecida	Os05g0375400	Beta-glucanase precursor.	2	0	150	0,002	77	100	2
Função não conhecida	Os06g0237400	Similar to Xyloglucan endotransglycosylase precursor	1	0	1131	0,00011	95	100	1
Função não conhecida	Os07g0556800	Ribosome-inactivating protein family protein.	1	0	665	0,00055	84	100	1
Função não conhecida	Os07g0691700	Conserved hypothetical protein.	1	0	631	0,0001	76	95	1
Função não conhecida	Os09g0547500	Similar to Lysine decarboxylase-like protein	1	0	452	0,068	80	95	1
Função não conhecida	Os09g0548200	Peptidoglycan-binding LysM domain containing protein.	1	0	3847	4e-7	82	100	1
Função não conhecida	Os10g0438500	Cyclin-like F-box domain containing protein.	1	0	6845	2e-6	81	100	1
Função não conhecida	Os11g0530600	Similar to Chalcone synthase C2	1	0	1220	6e-18	94	100	1
Função não conhecida	Os01g0293100	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein	0	2	600	0,0028	83	95	2
Função não conhecida	Os01g0327100	Haem peroxidase family protein.	0	2	308	0,003	55	100	2
Função não conhecida	Os01g0944700	Similar to Beta-1,3-glucanase precursor.	0	1	172	0,033	41	100	1
Função não conhecida	Os01g0952000	Germin family protein	0	2	475	0,00045	93	100	2
Função não conhecida	Os02g0249900	Glutelin precursor.	0	1	224	0,008	46	100	1
Função não conhecida	Os02g0581800	Conserved hypothetical protein.	0	2	8746	2e-5	100	100	2
Função não conhecida	Os03g0215200	Drooping leaf protein.	0	1	331	0,007	76	90	1
Função não conhecida	Os03g0657400	DNA-binding WRKY domain containing protein.	0	1	521	0,071	70	90	1
Função não conhecida	Os03g0766100	Plant lipid transfer/seed storage/trypsin-alpha amylase inhibitor domain containing protein.	0	1	3847	4e-7	93	100	1
Função não conhecida	Os04g0417000	Similar to Aluminum-activated malate transporter.	0	1	7465	2e-6	76	100	1

continuação TABELA 11. Análise da similaridade dos clones sequenciados e isolados na técnica de SSH na presença e ausência de degrane

Função não conhecida	Os04g0516200	Protein of unknown function DUF640 domain containing protein.	0	1	2220	6e-18	95	100	1
Função não conhecida	Os04g0677600	Conserved hypothetical protein.	0	1	1001	0,0003	83	95	1
Função não conhecida	Os05g0517400	Conserved hypothetical protein.	0	1	700	0,0001	87	91	1
Função não conhecida	Os06g0517300	Thionin family protein.	0	1	4682	3e-5	65	100	1
Função não conhecida	Os07g0216700	Cereal seed allergen, trypsin/alpha-amylase inhibitor family protein.	0	1	5681	0,007	96	92	1
Função não conhecida	Os10g0450900	Similar to Glycine-rich cell wall structural protein 2 precursor.	0	1	4123	0,00011	85	100	1
Função não conhecida	Os12g0155100	Conserved hypothetical protein	0	1	1801	0,001	97	100	1
Função não conhecida	Os12g0247700	Similar to Jasmonate-induced protein.	0	1	30500	0,0004	100	100	1
Predição de função geral	Os02g0228300	Protein kinase-like domain containing protein	1	0	108	0,003	45	100	1
Predição de função geral	Os02g0483800	Transferase family protein	1	0	72	0,073	21	100	1
Predição de função geral	Os06g0363701	Reverse transcriptase, RNA-dependent DNA polymerase family protein	3	0	382e5	2e-7	100	100	3
Predição de função geral	Os11g0312782	Chromatin associated protein KT112 family protein	2	0	220	6e-18	34	100	2
Predição de função geral	Os11g0569500	Similar to Receptor kinase-like protein	1	2	497	0,001	87	91	3
Predição de função geral	Os11g0569600	Similar to Receptor kinase-like protein	0	2	6885	2e-6	75	100	2
Predição de função geral	Os08g0512600	Protein cdc2 kinase.	1	0	5733	5e-6	85	100	1
Predição de função geral	Os10g0118200	Similar to O-methyltransferase ZRP4 (EC 2.1.1.-) (OMT).	0	2	890	0,0019	86	100	2
Predição de função geral	Os12g0114100	Similar to MAP kinase-like protein.	0	1	3387	3e-04	80	100	1
Subtotal			9	11					20
Grupo V – Sem similaridade									
Subtotal			2	1					3
Total			103	51					154

O agrupamento dos clones SSH obtidos na biblioteca PD mostra que 61% dos clones apresentam funções conhecidas relacionadas ao processamento e armazenamento da informação (Grupo I), sinalização e processos celulares (Grupo II) e metabolismo (Grupo III) (Figura 25). Entretanto, na biblioteca AD apenas 33% dos clones apresentam funções conhecidas, sendo que o grupo I não apresentou nenhum clone (Figura 26).

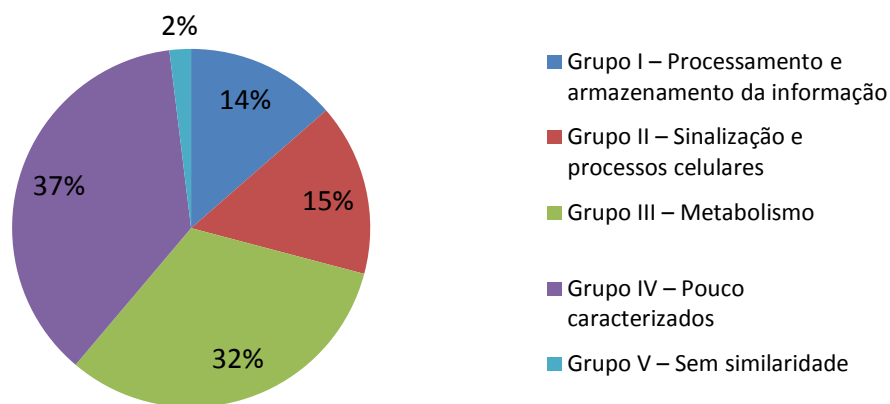


FIGURA 25. Agrupamento dos clones SSH obtidos na biblioteca “presença de degrane” (PD) em arroz utilizando o programa COGs do NCBI.

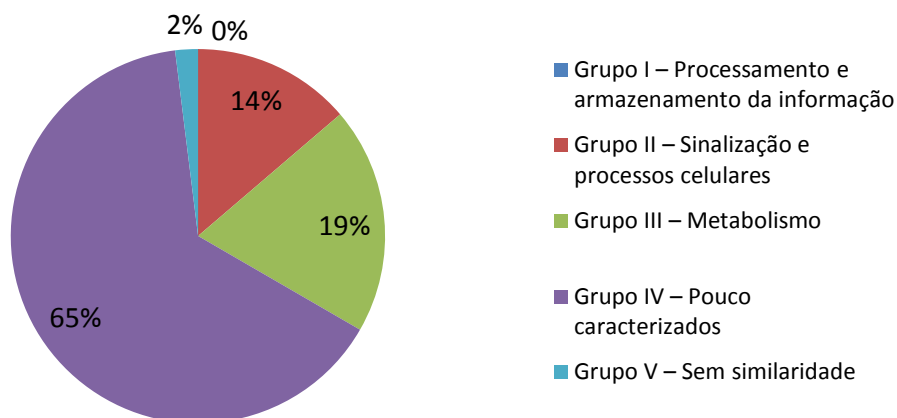


FIGURA 26. Agrupamento dos clones SSH obtidos na biblioteca “ausência de degrane” (AD) em arroz utilizando o programa COGs do NCBI.

Apenas 2% dos clones sequenciados em ambas as bibliotecas não apresentaram similaridade de proteínas nos bancos de dados disponíveis para arroz (Figura 27 e 28). Entretanto, o somatório do número de sequências de função não conhecida e de predição de função geral foi de 37 e 65% nas bibliotecas PD e AD, respectivamente. Os demais clones apresentaram sequências agrupadas em categorias funcionais.

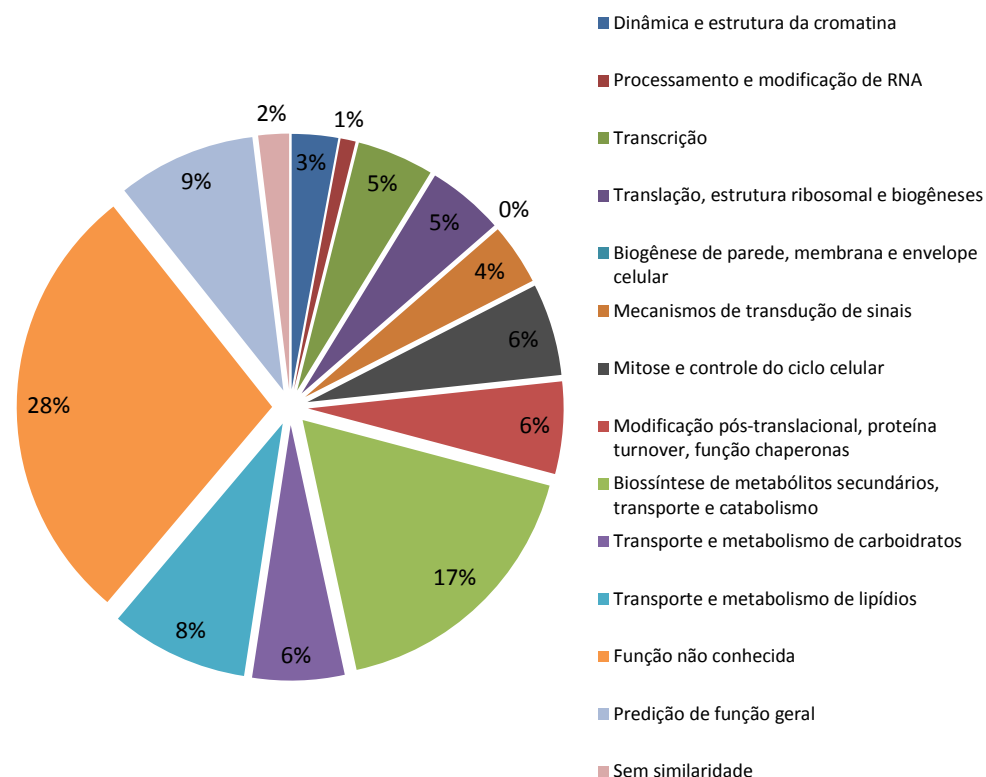


FIGURA 27. Categorização funcional dos clones SSH obtidos na biblioteca “presença de degrane” (PD) em arroz utilizando o programa COGs do NCBI.

A zona de abscisão entre o grão do arroz e o pedicelo é formada por uma única camada de pequenas células com a parede celular fina (Li *et al.*, 2006b). No momento da coleta do material vegetal para a extração do RNA foi cortado 1,5 mm da parte da flor e 1,0 mm da parte do pedicelo. Dessa forma, o

RNA extraído compreende outras células em adição as da zona de abscisão, pois é praticamente impossível fazer uma extração somente da camada de células responsável pela queda do grão. Dessa forma, serão discutidos os genes pertencentes às categorias funcionais que possam estar envolvidos diretamente com a presença ou ausência de degrane e sua regulação, como por exemplo, biogênese de parede e transcrição. Genes presentes nas categorias funcionais de transporte e metabolismo de carboidratos e lipídios não serão discutidos, pois provavelmente não estão relacionados ao degrane. Certamente, a presença destes genes está relacionada ao tecido vegetal amostrado, que possui direta relação com o transporte de assimilados para o grão.

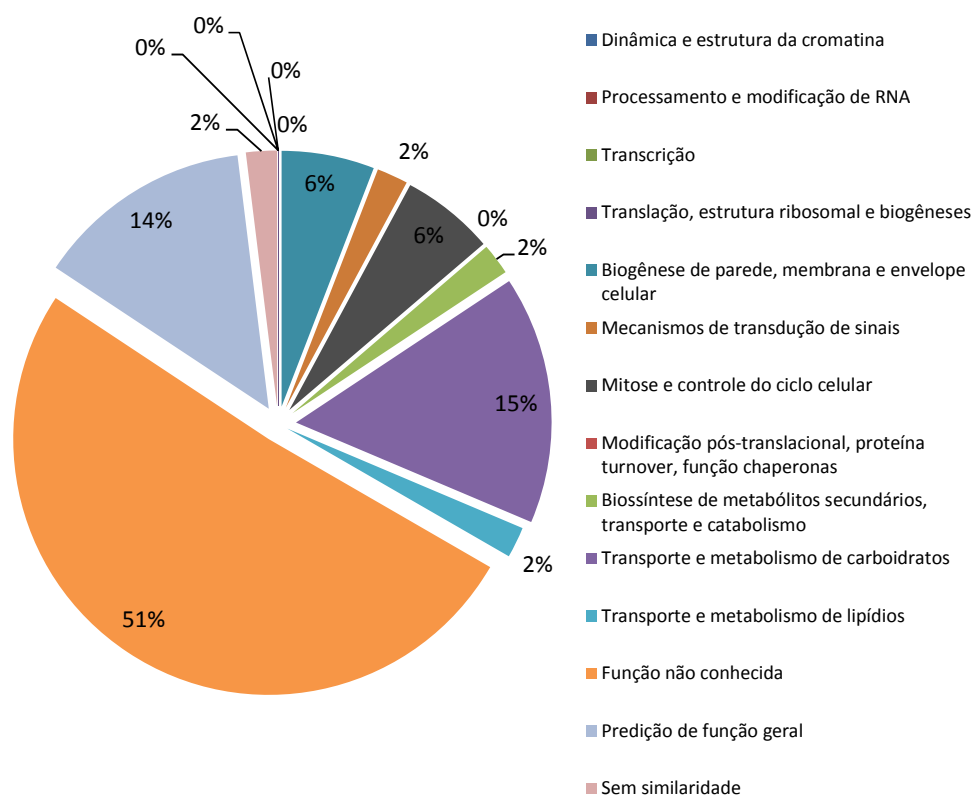


FIGURA 28. Categorização funcional dos clones SSH obtidos na biblioteca "ausência de degrane" (AD) em arroz utilizando o programa COGs do NCBI.

Os genes obtidos pela técnica SSH que serão discutidos nos subitens a seguir foram validados a partir do banco de dados RiceXPro (Rice Expression Profile Database). Este banco de dados possui o perfil de expressão gênica do arroz cultivado no campo através da técnica de microarranjo (Sato *et al.*, 2011b) e permite a visualização das mudanças da transcrição ao longo do crescimento da planta (Sato *et al.*, 2011a). RiceXPro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) possui três conjuntos de dados. O primeiro perfil corresponde a expressão gênica contínua na folha desde o transplante até a colheita, o segundo trata da expressão na raiz em diferentes estágios de desenvolvimento e tipos de tecidos e o terceiro perfil mostra a expressão de genes com variação no tempo e no espaço em vários órgão e tecidos (Sato *et al.*, 2011b). Este último perfil de expressão foi utilizado para a validação dos genes encontrados pela metodologia SSH. Foram considerados como validados aqueles genes que apresentaram no banco de dados altos níveis de expressão em pelo menos um dos seguintes órgãos: inflorescência, anteras, pistilos, pálea, lema e ovário, por serem estruturas que apresentam relação com tecido vegetal amostrado para a realização deste estudo.

4.4.1 Processamento e armazenamento da informação

4.4.1.1 Dinâmica e estrutura da cromatina

Neste grupo funcional foram identificados na biblioteca PD dois genes que codificam proteínas do tipo histonas. Os genes Os03g0162200 e Os04g0419600 codificam as histonas das classes H2A e H3, respectivamente. As histonas no geral possuem como função principal a regulação gênica e podem sofrer modificações pós-traducionais que atuam na regulação gênica de

forma epigenética (Jacob *et al.*, 2010). A eficiência da expressão gênica é altamente influenciada pela estrutura da cromatina que pode ser modulada de forma epigenética pelos processos de metilação do DNA e modificações pós-transcricionais das histonas. Essas modificações em histonas das classes H2A, H2B, H3 e H4 influenciam na densidade dos nucleossomos e permitem uma maior eficiência dos fatores de transcrição e atividade transcricional (Chinnusamy & Zhu, 2009; Kim *et al.*, 2010). A presença dos genes H2A e H3 na biblioteca PD por si só não comprova que nas mesmas ocorram estas modificações pós-transcricionais, mas pode indicar uma menor atividade transcricional em células com maior degradação da parede celular devido à função das histonas na regulação gênica.

4.4.1.2 Processamento e modificação de RNA

Na biblioteca PD foi detectado o gene Os08g0288500 que codifica uma proteína contendo um domínio D111/G-patch. Este domínio possui um sítio de ligação a RNA e também tem a função de reparo a danos ocorrido ao DNA. Dessa forma, esta proteína está relacionada ao processamento e modificação de RNA. Assim, a expressão deste gene na biblioteca PD pode indicar que esta proteína pode modificar determinado RNA relacionado ao degrane tornando-a mais efetiva na ocorrência da queda dos grãos.

4.4.1.3 Transcrição

Com relação a categoria funcional transcrição foram encontrados quatro genes na biblioteca PD. Dois destes genes, Os04g0580700 e Os09g0507200 codificam proteínas da família MADS Box. As proteínas desta família possuem domínio de ligação ao DNA e geralmente atuam como fatores de transcrição. Nas plantas, os genes MADS box estão envolvidos no controle de aspectos

importantes do desenvolvimento vegetal. Muitos destes controles estão envolvidos com a inflorescência, como o desenvolvimento do gametófito, do embrião, semente e flores (Becker & Theissen, 2003). Devido à grande influência desta família gênica no controle dos processos da inflorescência, é bem provável que estes genes não estejam envolvidos de forma direta sobre a presença do degrane.

Os outros dois genes encontrados na biblioteca PD, Os08g0433400 e Os09g0455200, estão associados com a repressão da transcrição. O gene Os09g0455200 codifica uma proteína com um domínio *Winged helix*. Muitas proteínas com funções biológicas diversas possuem este domínio, incluindo a repressão transcricional (Aravind *et al.*, 2005). Já o gene Os08g0433400 codifica uma proteína repressora da transcrição do tipo MYB4. As proteínas da família MYB são fatores de transcrição que possuem um importante papel regulatório no desenvolvimento e nas respostas de defesa das plantas (Chen *et al.*, 2006). Em algumas espécies, proteínas da família MYB são componentes essenciais envolvidos no *splicing* do RNA (Zhao *et al.*, 2007b). Portanto, os genes repressores presentes na biblioteca PD podem estar envolvidos na inativação de genes que atuam na ausência do degrane. Por exemplo, o gene *OsCPL1* é um gene com ação comprovada sobre o degrane, onde a sua expressão contribui para a ausência do degrane, e a inibição da expressão deste gene *OsCPL1* aumentou os níveis de degrane em arroz (Ji *et al.*, 2010).

4.4.2 Sinalização e processos celulares

4.4.2.1 Biogênese de parede, membrana e envelope celular

Em três clones da biblioteca AD foi encontrado o gene Os09g0248100 que codifica uma proteína que contém o domínio Beta-Ig-H3/fasciclin. O domínio fasciclin é um módulo extracelular de aproximadamente 140 nucleotídeos que pode estar relacionado à adesão celular em plantas e em animais (Faik *et al.*, 2006). As proteínas de adesão celular permitem a ligação entre células vizinhas e permite a formação e a manutenção da integridade dos tecidos (Clout *et al.*, 2003). Como a expressão deste gene está presente na biblioteca de ausência de degrane (AD), as proteínas geradas poderiam estar conservando a manutenção das células da camada de abscisão retardando que o processo de degrane ocorra. O uso de técnicas de biologia molecular como, por exemplo, o silenciamento ou a superexpressão gênica são ferramentas que poderão ser utilizadas para avaliar com maior apuração o real papel deste gene sobre o degrane.

4.4.3 Metabolismo

4.4.3.1 Transporte e metabolismo de carboidratos

Dois clones da biblioteca “AD” apresentaram genes relacionados a *glycosyl transferase*. Os genes Os03g0184300 e Os09g043300 codificam enzimas *glycosyl transferase* das famílias 8 e 31, respectivamente. Estas enzimas atuam como catalisadoras da transferência de uma unidade monossacarídeo para uma molécula de açúcar ativa. O resultado desta transferência pode ser a formação de polissacarídeos (Lairson *et al.*, 2008). O principal componente da parede celular é um polissacarídeo, a celulose, que é

formada por moléculas de glicose unidas pelas extremidades. Outros componentes da parede celular são a hemicelulose, glicoproteínas e lignina (Cosgrove, 2005). Portanto, a expressão destes genes indica atividades das enzimas *glycosyl transferase* para a manutenção da parede celular e evitar a presença do degrane, pois a glicosilação é a principal reação de modificação que ocorre na biossíntese de compostos naturais (Ko *et al.*, 2006).

Já na biblioteca PD três clones correspondem ao gene Os11g0184200 que codifica uma proteína da família 1 da *glycoside hydrolase* e dois clones correspondem ao gene Os03g0703100 que codifica uma enzima similar a *beta-glucosidase*. A família 1 da *glycoside hydrolase* é composta por um vasto grupo de enzimas, dentre elas a *beta-glucosidase*, que são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas entre carboidratos ou entre um carboidrato e um não carboidrato (Hill & Reilly, 2008). A principal reação destas enzimas é catalisar a hidrólise de ligações beta-glicosídicas. As funções destas enzimas em plantas são variadas, entre elas está a degradação de componentes da parede celular de frutos em processo de amadurecimento (Faure, 2002). Assim, existe uma possibilidade que a expressão deste gene em dois clones da biblioteca PD possa estar envolvida com a degradação da parede celular das células da zona de abscisão e conseqüentemente na presença do degrane.

5 CONCLUSÕES

Os genótipos de arroz apresentaram elevada variabilidade fenotípica do degrane variando de 20 a 270 gf. Os ecótipos de arroz vermelho apresentaram elevados níveis de degrane.

A variabilidade fenotípica do degrane presente nos genótipos avaliados está associada a diferentes genes. Esta variabilidade pode ser gerada através da expressão diferenciada desses genes ou através da variabilidade nucleotídica que modifica a composição da proteína.

A expressão diferenciada dos genes *OsCPL1* e *OsXTH8* está relacionada com a ativação do processo de abscisão, quanto maior seus níveis de expressão maior será o nível de degrane. Já a expressão do gene *OsCel9D* está relacionada com a repressão do processo de abscisão nos genótipos avaliados. O gene *qSH1* comumente relacionado com o degrane em outros estudos não possui efeito nos genótipos avaliados.

A variabilidade nucleotídica do gene *Os08g0512400* está relacionada com a mudança nos níveis de degrane. Na região regulatória 5' deste gene os genótipos que apresentam o nucleotídeo T na posição 1271 *upstream* do gene em geral possuem elevado degrane, enquanto que os genótipos que apresentam o nucleotídeo A possuem baixo degrane. Além disso, a variação

nucleotídica do exon 5 do gene *Os01g0849100* apresentou dois SNPs, nas posições 2981 e 3057, que estão relacionados ao degrane em arroz. Os genótipos que possuem nas posições 2981 e 3057 os nucleotídeos G e T, respectivamente, possuem elevado degrane. Os genótipos que possuem médio degrane possuem os nucleotídeos A e T nas posições citadas. Por fim, os genótipos que possuem os nucleotídeos G e G nas posições 2981 e 3057, respectivamente, tendem a possuir menor degrane.

A técnica SSH foi eficiente na detecção de genes possivelmente relacionados com o degrane. Uma série de genes detectados através do sequenciamento de 154 clones ajudará no entendimento do processo de degrane. A construção da biblioteca de hibridização subtrativa nos sentidos direto e reverso possibilitou identificar genes promissores sobre a presença e ausência de degrane. Análises mais detalhadas destes genes poderão ser realizadas na tentativa de comprovar sua função.

Além da importância de genes conhecidos como *OsCPL1*, os genes *OsXTH8*, *OsCel9D*, *Os08g0512400* e *Os01g0849100* também estão relacionados ao degrane de sementes em arroz.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASAKA, M. et al. Histological and genetic characteristics associated with the seed-shattering habit of weedy rice (*Oryza sativa* L.) from Okayama, Japan. **Breeding Science**, Tokyo, v. 61, n. 2, p. 168-173, 2011.

AL-AHMAD, H.; GALILI, S.; GRESSEL, J. Tandem constructs to mitigate transgene persistence: tobacco as a model. **Molecular Ecology**, Malden, v. 13, n. 3, p. 697-710, 2004.

AL-AHMAD, H.; GALILI, S.; GRESSEL, J. Infertile interspecific hybrids between transgenically mitigated *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana sylvestris* did not backcross to *N. sylvestris*. **Plant Science**, Clare, v. 170, n. 5, p. 953-961, 2006.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANSARI-MAHYARI, S.; BERG, P.; LUND, M. S. Fine mapping quantitative trait loci under selective phenotyping strategies based on linkage and linkage disequilibrium criteria. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Malden, v. 126, n. 6, p. 443-454, 2009.

ARAVIND, L. et al. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. **Fems Microbiology Reviews**, Malden, v. 29, n. 2, p. 231-262, 2005.

AVILA, L. A. D. et al. 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.

BALBINOT JUNIOR, A. A. et al. Competitividade de cultivares de arroz irrigado com cultivar simuladora de arroz-vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 53-59, 2003.

BECKER, A.; THEISSEN, G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 29, n. 3, p. 464-489, 2003.

BERKEN, A.; THOMAS, C.; WITTINGHOFER, A. A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. **Nature**, London, v. 436, n. 7054, p. 1176-1180, 2005.

CAI, H. W.; MORISHIMA, H. Genomic regions affecting seed shattering and seed dormancy in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, n. 6, p. 840-846, 2000.

CAMP, N. J.; COX, A. **Quantitative trait loci: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2002. 376 p. (Methods in Molecular Biology).

CAO, Y. et al. Al toxicity leads to enhanced cell division and changed photosynthesis in *Oryza rufipogon* L. **Molecular Biology Reports**, Malden, v. 38, n. 8, p. 4839-4846, 2011.

CHEN, Y. H. et al. The MYB transcription factor superfamily of arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 60, n. 1, p. 107-124, 2006.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J. K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 2, p. 133-139, 2009.

CLARK, R. M. Genome-wide association studies coming of age in rice. **Nature Genetics**, London, v. 42, n. 11, p. 926-927, 2010.

CLONTECH. **PCR-Select cDNA Subtraction kit Kit User Manual**. Mountain View: Clontech Laboratories, 2008.p.

CLOUT, N. J.; TISI, D.; HOHENESTER, E. Novel fold revealed by the structure of a FAS1 domain pair from the insect cell adhesion molecule fasciclin I. **Structure**, Cambridge, v. 11, n. 2, p. 197-203, 2003.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

DELOUCHE, J. C. et al. **Weedy rices-origin, biology, ecology, and control**. Rome: FAO, 2007. 144 p. (FAO plant production and protection paper, 188).

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 93, n. 12, p. 6025-6030, 1996.

DO LAGO, A. A. **Characterization of red rice (*Oryza sativa* L.) phenotypes in Mississippi**. 1982. 143 f. Ph. D - Agricultural and Biological Engineering, Mississippi State University, Starkville, 1982.

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Oklahoma, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- DUSSAULT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, New York, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2006.
- FAIK, A.; ABOUZOUHAIR, J.; SARHAN, F. Putative fasciclin-like arabinogalactan-proteins (FLA) in wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*): identification and bioinformatic analyses. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 276, n. 5, p. 478-494, 2006.
- FAURE, D. The family-3 glycoside hydrolases: from housekeeping functions to host-microbe interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1485-1490, 2002.
- FENG, Q. et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4. **Nature**, London, v. 420, n. 6913, p. 316-320, 2002.
- GEALY, D. R.; MITTEN, D. H.; RUTGER, J. N. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. saliva*): implications for weed management. **Weed Technology**, Champaign, v. 17, n. 3, p. 627-645, 2003.
- GRESSEL, J.; VALVERDE, B. E. A strategy to provide long-term control of weedy rice while mitigating herbicide resistance transgene flow, and its potential use for other crops with related weeds. **Pest Management Science**, Malden, v. 65, n. 7, p. 723-731, 2009.
- GU, X. Y. et al. Genetic analysis of adaptive syndromes interrelated with seed dormancy in weedy rice (*Oryza sativa*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, n. 6, p. 1108-1118, 2005.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 95-98, 1999.
- HILL, A. D.; REILLY, P. J. Computational analysis of glycoside hydrolase family 1 specificities. **Biopolymers**, Malden, v. 89, n. 11, p. 1021-1031, 2008.
- HILLMANN, A.; DUNNE, E.; KENNY, D. cDNA Amplification by SMART-PCR and Suppression Subtractive Hybridization (SSH)-PCR. **Methods in Molecular Biology**, Malden, v. 496, n. 4, p. 223-243, 2009.
- HUANG, X. H. et al. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. **Nature Genetics**, London, v. 42, n. 11, p. 961-967, 2010.
- HUANG, X. W. et al. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 76, n. 4, p. 753-760, 2007.

IRGA. **Relatório final de colheita do arroz irrigado no Rio Grande do Sul - Safra 2009/10**. Porto Alegre: Irga - Política Setorial, 2010. 6 p.

IRRI. **Descriptors for rice *Oryza sativa* L.** Los Baños: Laguna, 1980. 21 p.

ITO, Y. et al. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. **Science**, Washington, v. 313, n. 5788, p. 842-845, 2006.

JACOB, Y. et al. Regulation of heterochromatic DNA replication by histone H3 lysine 27 methyltransferases. **Nature**, London, v. 466, n. 7309, p. 987-991, 2010.

JAN, A. et al. Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 3, p. 3670-3681, 2004.

JENA, K. K. The species of the genus *Oryza* and transfer of useful genes from wild species into cultivated rice, *O. sativa*. **Breeding Science**, Tokyo, v. 60, n. 5, p. 518-523, 2010.

Jl, H. et al. Inactivation of the CTD phosphatase-like gene *OsCPL1* enhances the development of the abscission layer and seed shattering in rice. **Plant Journal**, Malden, v. 61, n. 1, p. 96-106, 2010.

Jl, H. S. et al. Characterization and mapping of a shattering mutant in rice that corresponds to a block of domestication genes. **Genetics**, Bethesda, v. 173, n. 2, p. 995-1005, 2006.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1-2, p. 25-34, 1997.

KIM, J. M. et al. Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. **Plant Cell and Environment**, Rockville, v. 33, n. 4, p. 604-611, 2010.

KINOSHITA, A. et al. Gain-of-function phenotypes of chemically synthetic CLAVATA3/ESR-related (CLE) peptides in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 48, n. 12, p. 1821-1825, 2007.

KO, J. H. et al. Molecular cloning, expression and characterization of a glycosyltransferase from rice. **Plant Cell Reports**, Rockville, v. 25, n. 7, p. 741-746, 2006.

KOBAYASHI, A. Varietal adaptability for mechanized rice cultivation: direct seeding adaptability, shattering habit, smoothness. **Journal of Agricultural Science (JPN)**, Ibaraki, v. 45, n. 4, p. 186-189, 1990.

KONISHI, S. et al. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. **Science**, Washington, v. 312, n. 5778, p. 1392-1396, 2006.

LAIRSON, L. L. et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 77, n. 4, p. 521-555, 2008.

LI, C. B.; ZHOU, A. L.; SANG, T. Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 170, n. 1, p. 185-193, 2006a.

LI, C. B.; ZHOU, A. L.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, Washington, v. 311, n. 5769, p. 1936-1939, 2006b.

LIN, Z. W. et al. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, Berlin, v. 226, n. 1, p. 11-20, 2007.

MAO, L. et al. JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. **Nature**, London, v. 406, n. 6798, p. 910-913, 2000.

MATTHEWS, J. M.; SUNDE, M. Zinc fingers--folds for many occasions. **IUBMB Life**, Malden, v. 54, n. 6, p. 351-355, 2002.

MI, X. J. et al. Regression-based multi-trait QTL mapping using a structural equation model. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, Berkeley, v. 9, n. 1, p. 1-21, 2010.

MOLDENHAUER, K. **Rice cultivar wells**. United States. Version Number, 28 ago. 2001.

MOLINA, J. et al. Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v. 108, n. 20, p. 8351-8356, 2011.

NAGAI, Y. S. et al. Sh3, a gene for seed shattering, commonly found in African in wild rices. **Rice Genetics Newsletter**, Mishima, v. 19, n. 1, p. 74-75, 2002.

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

OSBORNE, D. J.; MORGAN, P. W. Abscission. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 8, n. 2, p. 103-129, 1989.

PATTERSON, S. E. Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 2, p. 494-500, 2001.

RAI, V. et al. Identification of genes involved in bamboo fiber development. **Gene**, Amsterdam, v. 478, n. 1-2, p. 19-27, 2011.

REBRIKOV, D. V. et al. Suppression subtractive hybridization. **Methods in Molecular Biology**, Malden, v. 258, n. 1, p. 107-134, 2004.

REEVES, R.; BECKERBAUER, L. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1519, n. 1-2, p. 13-29, 2001.

ROBERTS, J. A.; ELLIOTT, K. A.; GONZALEZ-CARRANZA, Z. H. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 131-158, 2002.

ROBERTS, J. A. et al. Cell separation processes in plants - models, mechanisms and manipulation. **Annals of Botany**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 223-235, 2000.

ROSE, J. K. C. et al. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1421-1435, 2002.

SATO, Y. et al. Field transcriptome revealed critical developmental and physiological transitions involved in the expression of growth potential in japonica rice. **Bmc Plant Biology**, London, v. 11, n. 2, p. 21-26, 2011a.

SATO, Y. et al. RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in japonica rice grown under natural field conditions. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 39, n. 10, p. D1141-D1148, 2011b.

SCHULER, M. A. Splice site requirements and switches in plants. **Nuclear Pre-Mrna Processing in Plants**, Berlin, v. 326, n. 1, p. 39-59, 2008.

SCHWANKE, A. M. L. et al. Caracterização morfológica de ecótipos de arroz daninho (*Oryza sativa*) provenientes de áreas de arroz irrigado. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 249-260, 2008.

SHIVRAIN, V. K. et al. Gene flow between Clearfield^(TM) rice and red rice. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 349-356, 2007.

SKOWYRA, D. et al. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. **Cell**, Cambridge, v. 91, n. 2, p. 209-219, 1997.

SMITH, C. W.; DILDAY, R. H. **Rice: origin, history, technology, and production**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003. 627 p.

SOBRIZAL et al. RFLP mapping of seed shattering gene on chromosome 4 in rices. **Rice Genetics Newsletter**, Mishima, v. 16, n. 1, p. 74-75, 1999.

SWEENEY, M. T. et al. Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 2, p. 283-294, 2006.

TAYLOR, J. E. et al. Characterization and accumulation pattern of an mRNA encoding an abscission-related β -1,4-glucanase from leaflets of *Sambucus nigra*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 24, n. 6, p. 961-964, 1994.

THURBER, C. S.; HEPLER, P. K.; CAICEDO, A. L. Timing is everything: early degradation of abscission layer is associated with increased seed shattering in U.S. weedy rice. **Bmc Plant Biology**, London, v. 11, n. 14, p. 1-10, 2011.

THURBER, C. S. et al. Molecular evolution of shattering loci in US weedy rice. **Molecular Ecology**, Malden, v. 19, n. 16, p. 3271-3284, 2010.

TUCKER, M. L. et al. Bean abscission cellulase: characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 88, n. 4, p. 1257-1262, 1988.

TUOMI, J. M. et al. Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. **Methods**, Malden, v. 50, n. 4, p. 313-322, 2010.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, n. Suppl. S, p. 71-74, 2007.

XIONG, L. X. et al. Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of rice using an F-2 population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 243-251, 1999.

YOSHIDA, K. et al. Carbohydrate-binding module of a rice endo-beta-1,4-glycanase, OsCel9A, expressed in auxin-induced lateral root primordia, is post-translationally truncated. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, n. 11, p. 1555-1571, 2006.

YU, H. C. et al. Roles of F-box proteins in plant hormone responses. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 915-922, 2007.

ZHANG, L. B. et al. Selection on grain shattering genes and rates of rice domestication. **New Phytologist**, Malden, v. 184, n. 3, p. 708-720, 2009.

ZHAO, H. H.; FERNANDO, R. L.; DEKKERS, J. C. M. Power and precision of alternate methods for linkage disequilibrium mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Bethesda, v. 175, n. 4, p. 1975-1986, 2007a.

ZHAO, J. F. et al. SAD2, an importin beta-like protein, is required for UV-B response in Arabidopsis by mediating MYB4 nuclear trafficking. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 11, p. 3805-3818, 2007b.

ZHOU, H. L. et al. OsGLU1, a putative membrane-bound endo-1,4-beta-D-glucanase from rice, affects plant internode elongation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 60, n. 1, p. 137-151, 2006.

ZIÓLKOWSKI, P. et al. Immunohistochemical and proteomic evaluation of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate in invasive ductal carcinoma of the breast. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2009, n. 1, p. 91-96, 2009.

continuação APÊNDICE 1. Conjunto de *primers* utilizados na tentativa de amplificação do gene *Sh4*.

Primer pair A

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	TCGCGGAGGAGGTTGTCCCA	Plus	20			59.54	65.00%
Reverse primer	ATGTCGGGCTCCTCTGCCGA	Minus	20			59.69	65.00%
Product length	422						

Primer pair B

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	TGCACTGGTTCTGGCTCCGG	Plus	20			59.90	65.00%
Reverse primer	ATGTCGGGCTCCTCTGCCGA	Minus	20			59.69	65.00%
Product length	394						

Primer pair C

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	AGCCGTTCTTCCAGCAGTAG	Plus	20	1329		59.64	55.00%
Reverse primer	CTCAGCTTGCCTTGGCTCT	Minus	19	1775		60.83	57.89%
Product length	447						

Primer pair D

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	AGCCGTTCTTCCAGCAGTAG	Plus	20	1329		59.64	55.00%
Reverse primer	ACACCAAACGCCTCAGCTT	Minus	19	1786		60.85	52.63
Product length	458						

Primer pair E

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CCACTTGTCAATTGCACTGGT	Plus	20	1294		59.60	50.00
Reverse primer	ACACCAAACGCCTCAGCTT	Minus	19	1786		60.85	52.63
Product length	493						

continuação APÊNDICE 1. Conjunto de *primers* utilizados na tentativa de amplificação do gene *Sh4*.

Primer pair F

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CCACTTGTTCATTGCACTGGT	Plus	20	1294		59.60	50.00
Reverse primer	CTCAGCTTGCCTTGGCTCT	Minus	19	1775		60.83	57.89%
Product length	482						

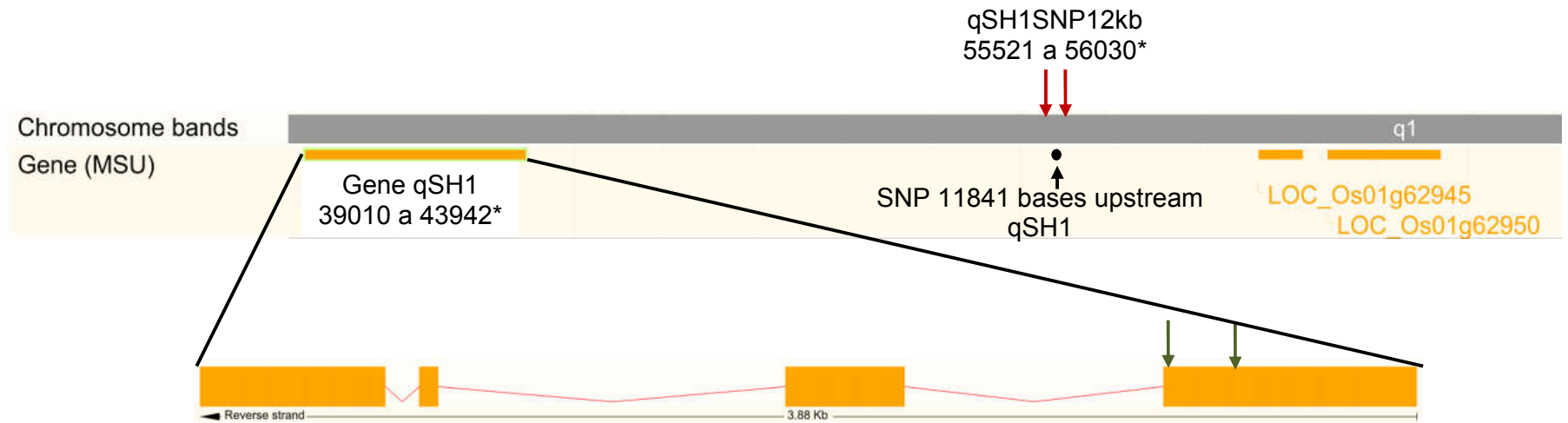
Primer pair G

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GCCGTTCTTCCAGCAGTAGT	Plus	20	1330		59.50	55.00%
Reverse primer	CTCAGCTTGCCTTGGCTCT	Minus	19	1775		60.83	57.89%
Product length	446						

Sh4SNPd

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	ACGGGCACCTGACTGCTAC	Plus	19			59.50	55.00%
Reverse primer	GAGAGCACCTCGGAGAGC	Minus	18			60.83	57.89%
Product length	511						

APÊNDICE 2. Representação esquemática do gene *qSH1* e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica

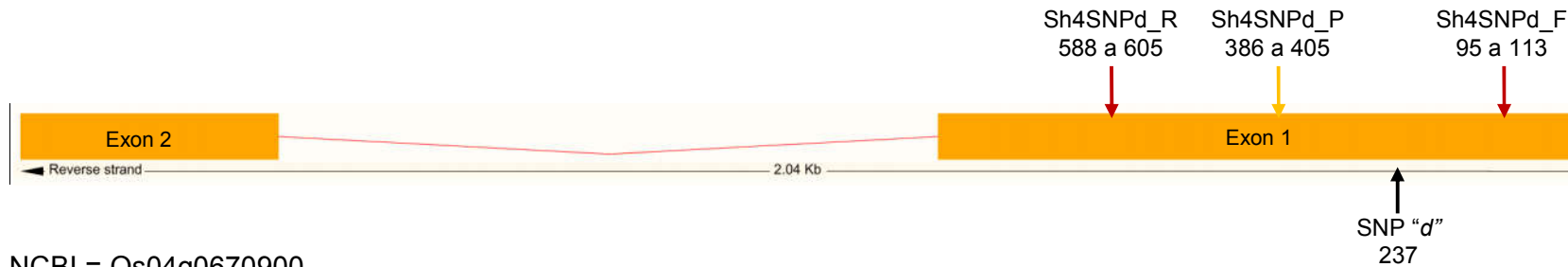


* Os números da posição do gene e SNP são em relação a sequência AP004127

As setas em vermelho delimitam a posição do *primer* utilizado para o sequenciamento (*qSh1*SNP12kb_F: 5'gtaaccttctggcacagc3'; *qSh1*SNP12kb_R: 3'gcggtagcacactagcatga5')

As setas em verde delimitam a posição do *primer* no Exon 1 utilizado para o PCR em tempo real (RTSh1_F:5'gcttcgtcttctccactgc3'; RTSh1_R:3'gcagagaagctgttcgagga 5'). Posição dos primers: 1029 e 1236 em relação ao exon 1.

APÊNDICE 3. Representação esquemática do gene *Sh4* e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica



NCBI = Os04g0670900

O artigo "Rice domestication by reducing shattering" mostra que há vários SNPs e INDELS no gene *Sh4*. Mas, dentre estes apenas o SNP denominado pelo autor como "d" teria efeito direto sobre o fenótipo (seta preta).

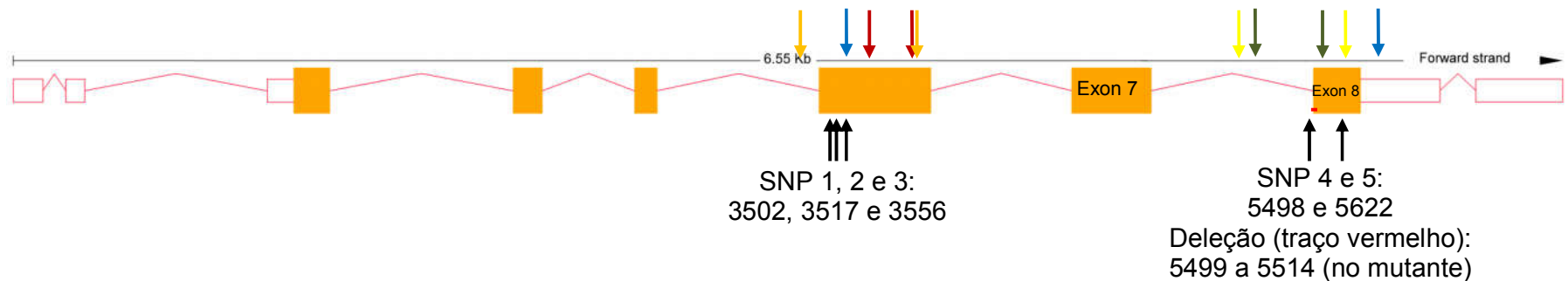
O SNP "d" está localizado no exon 1 do gene *Sh4*, na posição 237 do gene (LOC_Os04g57530:LOC_Os04g57530.1 cds:KNOWN_protein_coding) e confere a mudança do códon AAG (silvestre, com deigrane) para AAT (cultivado, menor deigrane) (frame 1 do LOC_Os04g57530). Esse SNP faz com que a proteína traduzida tenha o aminoácido asparagina (N, Asn) no material cultivado e não mais o aminoácido lisina (K, Lys) como no material silvestre, na posição 79 da proteína (LOC_Os04g57530:LOC_Os04g57530.1 peptide: LOC_Os04g57530.1 pep:KNOWN_protein_coding) [Arquivo Bioedit:Gene Sh4 japonica ou Gene Sh4 indica]

As setas em vermelho delimitam a posição do primer utilizado para o sequenciamento (Sh4SNPd_F 5' acgggcacctgactgctac 3' e Sh4SNPd_R: 3' gagagcacctcggagagc 5');

A seta em amarelo delimita a posição do primer utilizado para o PCR em tempo real junto com o primer Sh4SNPd_R (Sh4SNPd_P: 5' accagtgcgatgacaagtgg 3').

Os fragmentos sequenciados inicialmente com os primers Sh4 do primeiro pedido não correspondem ao gene *Sh4*, mas sim 664 bases upstream do gene *Sh4*.

APÊNDICE 4. Representação esquemática do gene *OsCPL1* e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica



Os SNPs (setas pretas) 1, 2, 3 e 5 foram localizados no alinhamentos disponibilizados por JI et al. (2009) no NCBI. O SNP 4 foi descrito pelo autor no fim do intron 7.

O primer representado por setas vermelhas é o *primer* utilizado para o trabalho de RT-PCR em tempo real (Primer Os07g0207700 posição 3702 e 3874: 5' tatcttgccatgcagcagtc 3' e 3' ttgcttggggagtaggacag 5').

O *primer* representado por setas azuis é o *primer* RTL1 utilizado por JI et al. (2009) para localizar a deleção (posição 3540 e 5768, 5' gggagcgatcacatacact 3' e 3' cataccagcccttctgcatt 5').

O *primer* representado por setas verdes é o *primer* RN2 utilizado por JI et al. (2009) (posição 5249 e 5527, 5' attggtcgaaattggtacta 3' e 3' tgccattgtctaactggaatccaaaggcc 5').

Primer laranja para os SNPs 1, 2 e 3

CPL1SNP123_F: TGCTCTCCATACCATGTTGC posição 3354

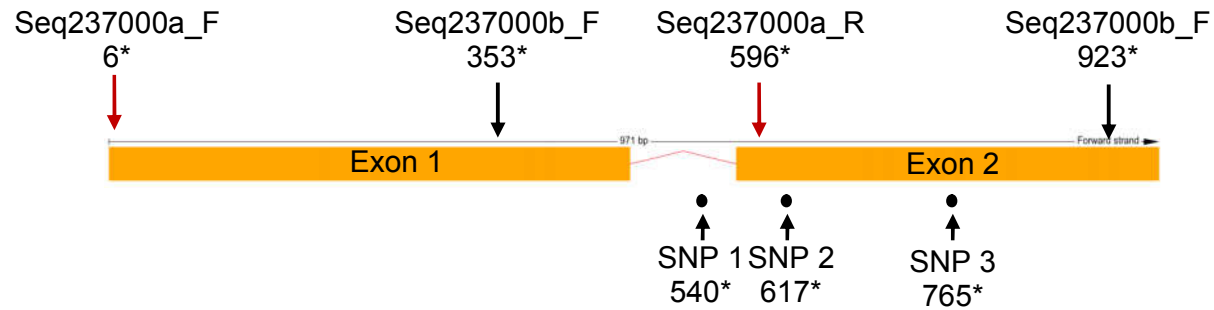
CPL1SNP123_R: CGAGTTTGCTTGGGGAGTAG posição 3844

Primer amarelo para os SNP 4, deleção e talvez o SNP 5 (de menor importância)

CPL1SNP4DEL_F: ATTTTGCTCACGGCATTTC posição 5199

CPL1SNP4DEL_R: ACCTTCTCACGGAGGTTGAA posição 5660

APÊNDICE 5. Representação esquemática do gene *OsXTH8* e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica



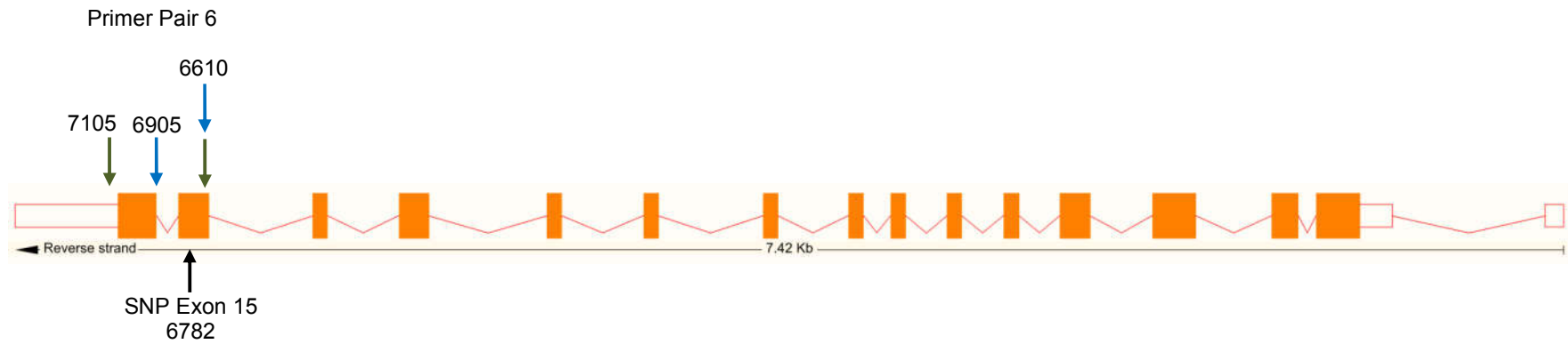
*8 dna:chromosome chromosome:Jan_2005:8:8958443:8959413:1 (Gramene)

SNP 1 = Intron 1

SNP 2 = Exon 2 (mutação nula = códons diferentes entre índica e japônica (A/G) mas gera o mesmo aminoácido)

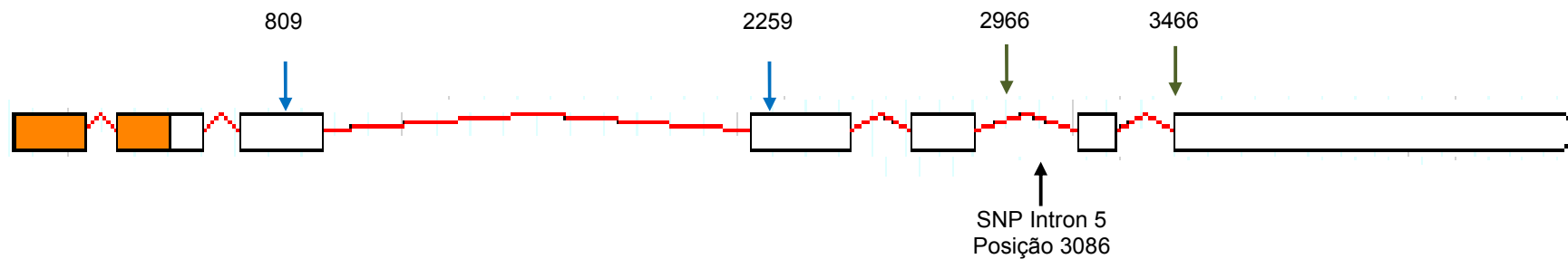
SNP 3 = Exon 3 (mutação não nula).

APÊNDICE 6. Representação esquemática do gene Os02g0613200 e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica.



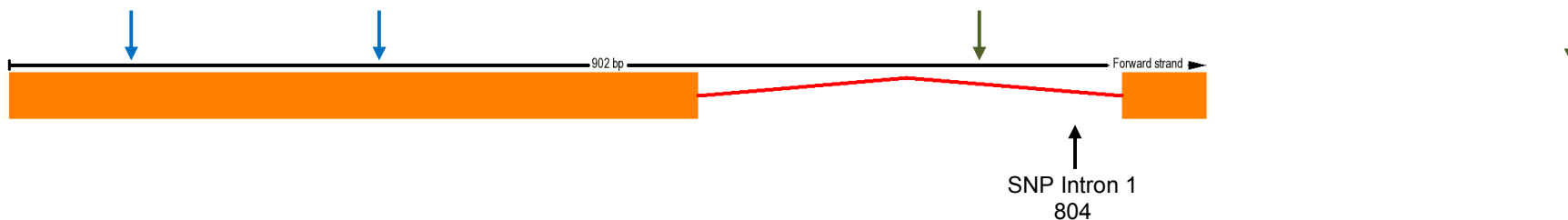
Setas verdes mostram a posição do par de primer utilizado para o sequenciamento genético.
Setas azuis mostram a posição do par de primer utilizado para a expressão gênica.

APÊNDICE 7. Representação esquemática do gene Os03g0745400 e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica.



Setas verdes mostram a posição do par de primer utilizado para o sequenciamento genético.
Setas azuis mostram a posição do par de primer utilizado para a expressão gênica.

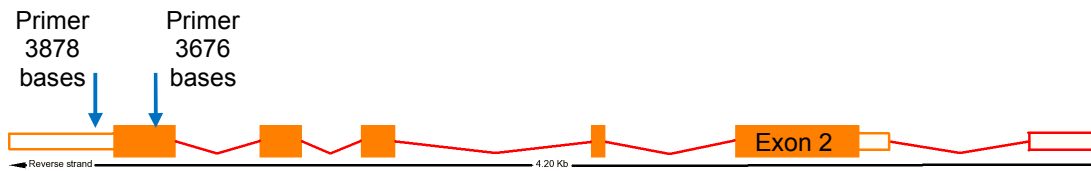
APÊNDICE 8. Representação esquemática do gene Os05g0117300 e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica.



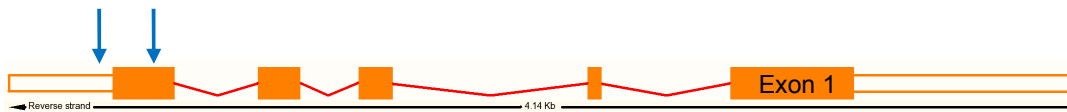
Setas verdes mostram a posição do par de primer utilizado para o sequenciamento genético.
Setas azuis mostram a posição do par de primer utilizado para a expressão gênica.

APÊNDICE 9. Representação esquemática do gene Os08g0512400 e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica.

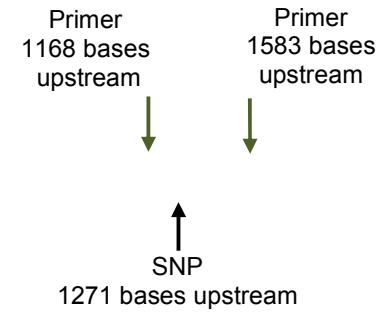
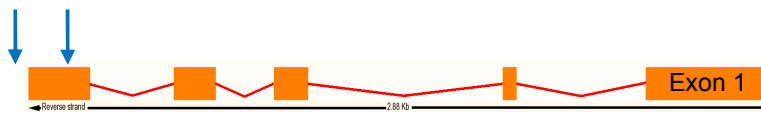
Gene Os08g0512400.1 para *Oryza sativa ssp. japonica*



Gene Os08g0512400.2 para *Oryza sativa ssp. japonica*

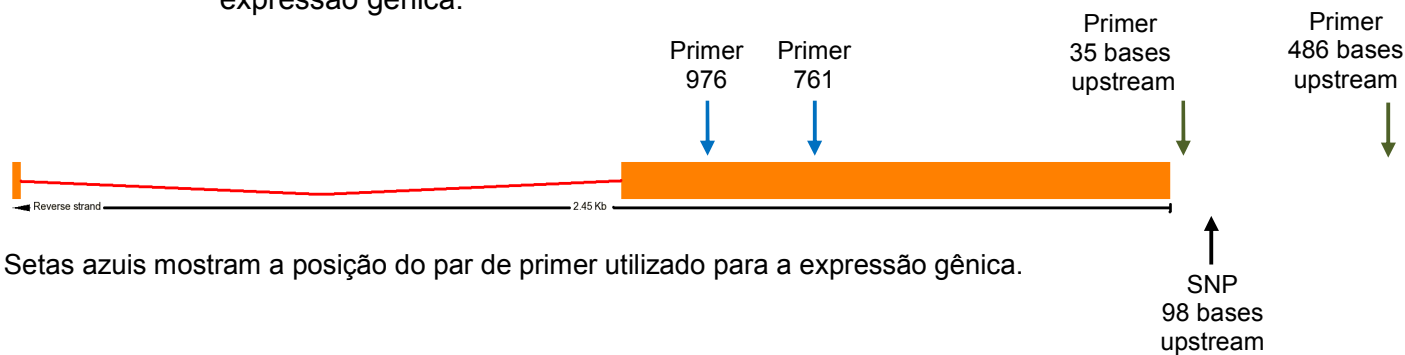


Gene Os08g0512400 para *Oryza sativa ssp. indica*



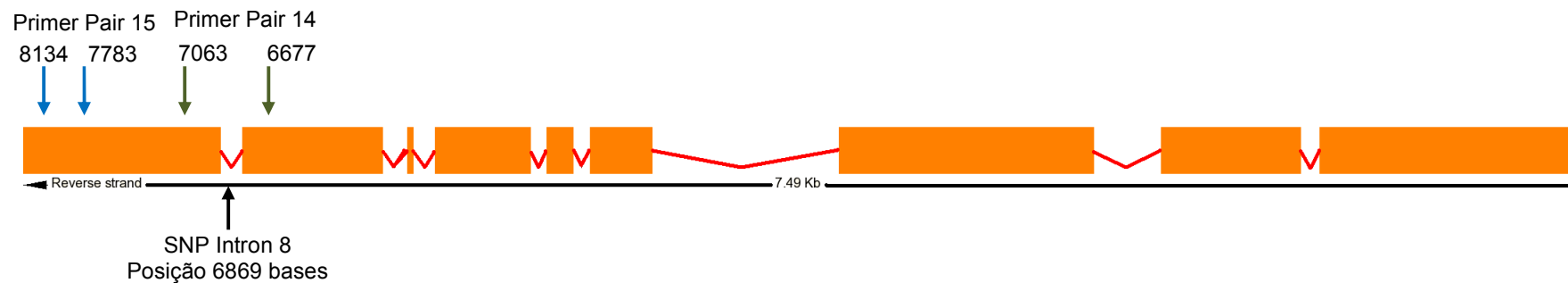
Setas verdes mostram a posição do par de primer utilizado para o sequenciamento genético. Setas azuis mostram a posição do par de primer utilizado para a expressão gênica.

APÊNDICE 10. Representação esquemática do gene Os10g0137700 e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica.



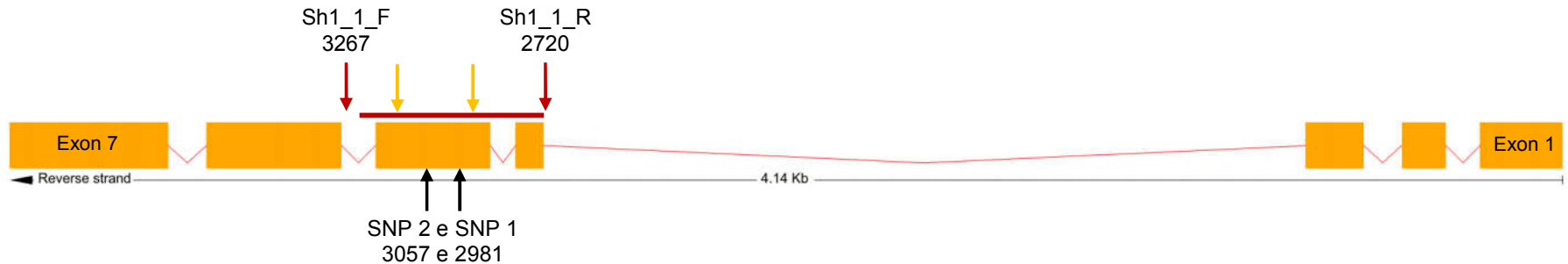
Setas azuis mostram a posição do par de primer utilizado para a expressão gênica.

APÊNDICE 11. Representação esquemática do gene Os11g0148700 e primers usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica.



Setas verdes mostram a posição do par de primer utilizado para o sequenciamento genético.
Setas azuis mostram a posição do par de primer utilizado para a expressão gênica.

APÊNDICE 12. Representação esquemática do gene Os01g0849100 e *primers* usados na amplificação para sequenciamento e expressão gênica



Os SNPs (setas pretas) 1 e 2 foram localizados nas sequências obtidas (traço vermelho) no exon 5;

As setas em vermelho delimitam a posição do primer utilizado para o sequenciamento (Sh1_1: 5' gccttcattctacatcca 3' e 3' catgacaagcagaccacgat 5');

O traço em vermelho é a posição das sequências obtidas;

As setas em amarelo delimitam a posição do primer utilizado para o RT-PCR em tempo real (Sh1_2_P: 5' atgctcagcttccttcaga 3' e Sh1_2_F: 3' tcaggacctccatttcag 5');

Obs: Apesar dos primers estarem nomeados com o nome Sh1, estes não estão relacionados com o gene Sh1

8 VITA

Anderson Luis Nunes é filho de Nair Demétrio Nunes e Pedro Simões Nunes. Nasceu em Laranjeiras do Sul – PR, em 12 de dezembro de 1981. Coursou Técnico em Agropecuária na Escola Municipal Ireneu Bornhausen na cidade de Abelardo Luz – SC entre os anos de 1997 e 1999. Em 2000, iniciou o curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) na cidade de Pato Branco – PR. Durante a graduação atuou em pesquisas relacionadas à determinação da evapotranspiração de culturas e o manejo integrado de plantas daninhas, recebendo o título de Engenheiro Agrônomo no ano de 2004. Em 2005, começou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Durante o mestrado realizou pesquisas com o comportamento de herbicidas residuais no solo, recebendo o título de Mestre em Fitotecnia em fevereiro de 2007. No mesmo ano foi Professor do Curso de Engenharia Agrônômica da UTFPR na cidade de Pato Branco – PR. Em março de 2008, ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia na UFRGS com apoio financeiro do CNPq.