

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

FLORESCIMENTO EM AVEIA HEXAPLOIDE: ANÁLISE FENOTÍPICA E
MOLECULAR

Nicole de Carvalho Barros
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre, (RS), Brasil
Agosto de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

de Carvalho Barros, Nicole
FLORESCIMENTO EM AVEIA HEXAPLOIDE: ANÁLISE
FENOTÍPICA E MOLECULAR / Nicole de Carvalho Barros. -
- 2015.
95 f.

Orientador: Itamar Cristiano Nava.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. Avena sativa L.. 2. vernalização. 3.
fotoperíodo. 4. linhagens recombinantes. 5. Vrn1. I.
Cristiano Nava, Itamar, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

NICOLE DE CARVALHO BARROS
Engenheira Agrônoma - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

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

Aprovado em: 25.08.2015
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 10.11.2015
Por

ITAMAR CRISTIANO NAVA
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

CARLA ANDRÉA DELATORRE
PPG Fitotecnia/UFRGS

LUIZ CARLOS FEDERIZZI
PPG Fitotecnia/UFRGS

MAGALI FERRARI GRANDO
Agronomia/UPF

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Itamar Cristiano Nava, pela oportunidade de desenvolvimento do Mestrado, pelos ensinamentos, principalmente aqueles ensinados por exemplos, e não por palavras. A sua ética profissional, como também, a sua dedicação e energia de trabalhar são características raras, merecidas de reconhecimento. Além de ter sido um excelente orientador, sempre acreditou no meu potencial, e isso foi essencial ao longo das minhas atividades requeridas pelo mestrado. Mais do que orientador e de acreditar em mim, é uma pessoa amiga e bondosa.

Agradeço também, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização do estudo de Mestrado, como também à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. Ao Departamento de Plantas de Lavoura, pelo convívio com os professores, e com os funcionários, sempre solícitos em ajudar nas necessidades dos alunos. Agradeço em especial ao Prof. Luiz Carlos Federizzi, ao Prof. Marcelo Teixeira Pacheco, à Prof. Carla Andrea Delatorre e ao Fábio Berndt pelo grande auxílio nas atividades de campo e de laboratório. Ao Departamento de Fitossanidade, em especial ao Prof. Marcelo Gravina e à colega Sara Hartke pelo acesso ao Laboratório de Fitopatologia Molecular e auxílio nas atividades de laboratório.

Agradeço aos meus colegas, em especial à Jéssica Ferreira, Francisco Gnocato, Andrew Rerison, Carolina Tessele, Sibila Nunes, Andriele Wairich, Yohanna Miotto, Ana Paula Coelho, Sara Hartke, Camila Nicolli, Matias José Führ, Aldana Santi e Fábio Berndt pela amizade, troca de conhecimento, ajuda mútua e momentos de descontração. Agradeço também, ao grupo de estudantes do Prof.

Itamar Cristiano Nava, em especial ao Cristiano Zimmer, Itacir Ubert e Matias Fuhr, pelo auxílio na execução e avaliação dos experimentos de campo realizados.

Agradeço aos meus pais, Augusto Portanova Barros e Magda Cristina de Carvalho Barros (*in memorian*) pelos ensinamentos de amor e honestidade. Agradeço a toda minha família, em especial aos meus irmãos Bruno e Gustavo Barros, à minha cunhada Lorena Barros e aos meus avós Déa e Bolivar Barros por sempre me incentivarem e estarem ao meu lado em todos os momentos, importantes ou não, da minha vida. Agradeço à Marina Machado, à Bertolina e à família Borges Marques de Goiânia, pessoas as quais considero minha segunda família.

Aos meus amigos, Marília Milani (que sempre me deu muita força), Lucécia Souza, Tammila Klug, Tiago Telesca, Daiane Lattuada, Thais Isquierdo, Maria Luisa Vian, Dieisson Pivoto, Cristiane Wesp, Sandra Rieth, Bruno Monte, Adriano Couto, Gabriel Conti, Guilherme Monte (*in memorian*), Rafael Mendes, Carolina Nunes e Camila Peter pela amizade duradoura, que multiplica alegrias e divide tristezas.

“Mais do que máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que inteligência, precisamos de amor e doçura. Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo estará perdido” – Charles Chaplin em O Grande Ditador (1940).

FLORESCIMENTO EM AVEIA HEXAPLOIDE: ANÁLISE FENOTÍPICA E MOLECULAR¹

Autora: Nicole de Carvalho Barros

Orientador: Itamar Cristiano Nava

RESUMO

O florescimento exerce um grande efeito no sucesso reprodutivo e adaptativo das plantas. A resposta a sinais ambientais, tais como fotoperíodo e vernalização, representa uma estratégia reprodutiva importante utilizada pela aveia (*Avena sativa* L.) e outros cereais. Esta estratégia visa garantir que o florescimento ocorra na época mais favorável dentro da estação de crescimento. Os objetivos deste estudo foram avaliar a variação fenotípica em uma população de linhagens recombinantes de aveia derivada do cruzamento entre genitores contrastantes para o florescimento e caracterizar sequências de nucleotídeos de aveia associadas com genes de vernalização. Uma população de 108 linhagens, derivada do cruzamento entre 'UFRGS 8' (insensível ao fotoperíodo e à vernalização) e 'UFRGS 930605' (sensível ao fotoperíodo e à vernalização) foi utilizada. Os experimentos foram conduzidos em duas épocas de semeadura, nos anos de 2013 e 2014. O número de dias ao florescimento e a resposta à semeadura no cedo foram avaliados. Pares de *primers* específicos para o gene *Vrn1* desenvolvidos a partir do alinhamento de sequências de trigo, cevada e azevém foram utilizados para amplificar e clonar sequências de aveia. A partir dos resultados do número de dias ao florescimento, as linhagens recombinantes foram classificadas como insensíveis, intermediárias e sensíveis a ambos sinais de fotoperíodo e vernalização. As linhagens recombinantes exibiram relação similar no número de dias ao florescimento, nas diferentes épocas de semeadura e anos avaliados. A resposta à semeadura no cedo apresentou valores negativos nos dois anos de avaliação para todas as linhagens e, associação negativa com o número de dias ao florescimento. A variação fenotípica do florescimento observada entre as linhagens recombinantes demonstrou a existência de diferentes mecanismos genéticos que controlam a resposta ao fotoperíodo e à vernalização. A análise molecular revelou a presença de pelo menos duas variações alélicas para o gene *Vrn1* nos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605. Entretanto, estas variações alélicas precisam ser validadas quanto ao seu potencial de uso em estudos que visam o mapeamento molecular do gene *Vrn1* em aveia.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (95 p.) Agosto, 2015.

FLOWERING TIME IN HEXAPLOID OAT: PHENOTYPIC AND MOLECULAR ANALYSIS¹

Author: Nicole de Carvalho Barros
Adviser: Itamar Cristiano Nava

ABSTRACT

Flowering time exerts a great effect in the reproductive and adaptive success of plants. The response to environmental cues, such as photoperiod and vernalization, represents an important reproductive strategy used by oat (*Avena sativa* L.) and other small grain cereals. This strategy aims to ensure that flowering occurs at the most favorable time within the growing season. The objectives of this study were to assess the phenotypic variation in a population of oat recombinant inbred lines derived from the cross between contrasting parental lines for flowering time and to characterize oat nucleotide sequences associated with vernalization genes. A population with 108 lines, derived from the cross between 'UFRGS 8' (insensitive to photoperiod and vernalization) and 'UFRGS 930605' (sensitive to photoperiod and vernalization) was used. The experiments were carried out in two growing seasons, over the years of 2013 and 2014. The number of days to flowering and the response to early sowing were evaluated. Specific primer pairs for the *Vrn1* gene developed from sequence alignments of wheat, barley and ryegrass were used to amplify and clone oat sequences. Considering the number of days to flowering, recombinant inbred lines were classified as insensitive, intermediate, and sensitive to both photoperiod and vernalization cues. The recombinant lines exhibited a similar relation in the number of days to flowering in different sowing dates and years evaluated. The response to early sowing showed negative values in the two years of evaluation for all the lines and, negative association with the number of days to flowering. Flowering phenotypic variation observed among the recombinant lines demonstrated the existence of different genetic mechanisms controlling the response to photoperiod and vernalization. The molecular analysis revealed the presence of at least two allelic variations for the *Vrn1* gene in the parental lines UFRGS 8 and UFRGS 930605. However, these allelic variations need to be validated as to its potential use in studies that aim the molecular mapping of the *Vrn1* gene in oat.

¹ Master thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (95 p.) August, 2015.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Introdução.....	3
2.2. Principais fatores que influenciam o florescimento.....	4
2.3. Ocorrência do florescimento em resposta ao fotoperíodo.....	10
2.4. Ocorrência do florescimento em resposta à vernalização.....	11
2.5. Bases genéticas e moleculares do fotoperíodo	13
2.6. Bases genéticas e moleculares da vernalização.....	16
2.7. Bases genéticas e moleculares da resposta ao fotoperíodo e à vernalização em <i>Brachypodium distachyon</i> e <i>Beta vulgaris</i>	21
2.8. Determinação do florescimento em resposta ao fotoperíodo e à vernalização em aveia hexaploide.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Análise fenotípica do florescimento em aveia.....	26
3.1.1. Material vegetal.....	26
3.1.2. Condução dos experimentos.....	27
3.1.3. Dados meteorológicos.....	28
3.1.4. Caracteres avaliados.....	29
3.1.5. Métodos estatísticos.....	30
3.2. Análise molecular do florescimento em aveia.....	32
3.2.1. Isolamento e purificação do DNA.....	32
3.2.2. Amplificação do gene Vrn1 em aveia.....	33
3.2.3. Clonagem e sequenciamento.....	35
3.2.4. Análise dos fragmentos clonados.....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Análise fenotípica do florescimento em aveia.....	41
4.2. Análise molecular do florescimento em aveia.....	59
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	86
7. REFERÊNCIAS.....	87

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Sequência, orientação e número de bases dos pares de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>Vrn1</i> de aveia, como também do par de <i>primers</i> candidato AM87.....	34
2. Soma térmica e número de dias de vernalização ocorridos nas épocas de semeadura do cedo e do tarde, nos anos de 2013 e 2014.....	42
3. Condições de fotoperíodo ocorridas durante o crescimento das plantas na época de semeadura do cedo e do tarde, nos anos de 2013 e 2014.....	42
4. Análise de variância do número de dias da emergência ao florescimento na época de semeadura do cedo (NDEF cedo), na época de semeadura do tarde (NDEF tarde) e da resposta à semeadura no cedo (RSC) dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605.....	53
5. Comparação de médias do número de dias da emergência ao florescimento na época de semeadura do cedo (NDEF cedo), na época de semeadura do tarde (NDEF tarde) e da resposta à semeadura no cedo (RSC) entre os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 avaliados nos anos de 2013 e 2014.....	54
6. Classificação das linhagens recombinantes de aveia quanto à sensibilidade ao fotoperíodo e à vernalização.....	56
7. Análise de variância do número de dias da emergência ao florescimento na época de semeadura do cedo (NDEF cedo), na época de semeadura do tarde (NDEF tarde) e da resposta à semeadura no cedo (RSC) das linhagens recombinantes avaliadas nos anos de 2013 e 2014.....	56
8. Comparação de médias do número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) na semeadura do cedo (NDEF cedo) e na semeadura do tarde (NDEF tarde), e da resposta à semeadura no cedo (RSC) entre as linhagens recombinantes de aveia avaliadas nos anos de 2013 e 2014.....	57
9. Coeficientes de correlação de <i>Pearson</i> entre o valor médio dos anos de 2013 e 2014 das variáveis NDEF, RSC, estatura de plantas, peso de panícula e comprimento de panícula da época de semeadura do cedo e da época de semeadura do tarde.....	58

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Modelo das principais rotas envolvidas no controle do florescimento em <i>Arabidopsis thaliana</i> . Flechas e “T” invertidos indicam indução e repressão, respectivamente. Legenda: <i>FLC</i> (<i>FLOWERING LOCUS C</i>), <i>CO</i> (<i>CONSTANS</i>), <i>FT</i> (<i>FLOWERING LOCUS T</i>), <i>SOC</i> (<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO</i>). Figura adaptada de Teotia & Tang (2015).....	8
2. Modelo de regulação gênica do florescimento em resposta à vernalização e ao fotoperíodo de cinco grupos de planta. A) <i>Arabidopsis thaliana</i> ; B) <i>Triticum aestivum</i> e <i>Hordeum vulgare</i> ; C) <i>Oryza sativa</i> ; D) <i>Brachypodium distachyon</i> e E) <i>Beta vulgaris</i>	23
3. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia, avaliadas nas épocas de semeadura do cedo e do tarde no ano de 2013, para o número de dias da emergência ao florescimento (NDEF). O NDEF observado para os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 nas duas épocas de semeadura é indicado na figura pelas setas.....	43
4. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia avaliadas nas épocas de semeadura do cedo e do tarde no ano de 2014, para o número de dias da emergência ao florescimento (NDEF). O NDEF observado para os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 nas duas épocas de semeadura é indicado na figura pelas setas.....	45
5. Diagrama do número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) em linhagens recombinantes de aveia. A época de semeadura do cedo é representada por caixas cinzas, enquanto que a época de semeadura do tarde é representada por caixas amarelas. Caixa cinza e amarela sem ranhuras representam o ano de 2013, e com ranhuras o ano de 2014. No interior das caixas, as linhas pretas representam medianas, enquanto que as linhas vermelhas representam médias. Os pontos pretos representam observações acima e abaixo dos percentis 0,9 e 0,1, respectivamente. Os pontos verdes representam o genitor UFRGS 8, enquanto que os pontos azuis representam o genitor UFRGS 930605.....	46

	Página
6. Regressão do NDEF das linhagens recombinantes (pontos pretos) e dos genitores UFRGS 8 (ponto maior de coloração branca) e UFRGS 930605 (xis branco) nos anos de 2013 e 2014.....	48
7. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre UFRGS 8 x UFRGS 930605 para a resposta à semeadura no cedo (RSC) no ano de 2013. As flechas apontam as classes da RSC dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605.....	49
8. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre UFRGS 8 x UFRGS 930605 para a resposta à semeadura no cedo (RSC) no ano de 2014. As flechas apontam as classes da RSC dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605.....	50
9. Relação entre o NDEF e a RSC das linhagens recombinantes (pontos pretos) e dos genitores UFRGS 8 (ponto maior de coloração branca) e UFRGS 930605 (xis branco).....	51
10. Gel de agarose do DNA amplificado pelos pares de <i>primers</i> Ver-1.1, Ver-1.18, Ver-1.19 e AM87 dos genitores UFRGS 8 (U8) e UFRGS 930605 (U6). L100 (Ladder de 100 pares de bases).....	59
11. Alinhamento da região do primeiro éxon (sequência padrão) do gene <i>Vrn1</i> , amplificada pelo <i>primer</i> Ver-1.1. Identidade molecular à primeira sequência do genitor UFRGS 8 (U8a) é representada por ponto. Bases dentro de quadrados representam SNP entre uma mesma sequência (a ou b). Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L., acesso AY747600.1).....	60
12. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente ao primeiro éxon do gene <i>Vrn1</i> amplificadas pelo par de <i>primers</i> Ver-1.1. Legenda: U8a (sequência “a” de UFRGS 8), U6b (sequência “b” de UFRGS 930605), Trigo (Proteína de <i>Triticum aestivum</i> L., acesso AAW73221.1).....	61
13. Alinhamento do terceiro ao quinto éxon do gene <i>Vrn1</i> amplificado pelo par de <i>primers</i> Ver-1.18. As regiões da primeira sequência em negrito (U8a) representam éxons; circuladas representam locais de <i>splicing</i> ; e as demais regiões representam íntrons. A identidade molecular à sequência U8a é representada por ponto, e ausência, por hífen. Bases dentro de quadrados representam SNP em regiões exônicas de um mesmo subgenoma entre diferentes genótipos. Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), U71 (UFRGS 881971, acesso HQ9110523), Trigo (<i>Triticuma estivum</i> L., acesso AY747600.1).....	63

14. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente ao quarto éxon do gene *Vrn1* amplificadas pelo par de *primers* Ver-1.18. Legenda: U8a (sequência “a” de UFRGS 8), U71 (UFRGS 881971, acesso HQ9110523), U8b (sequência “b” de UFRGS 8), Trigo (Proteína de *Triticum aestivum* L., acesso AAW73221.1)..... 66
15. Alinhamento do quinto ao sexto éxon do gene *Vrn1* amplificado pelo par de *primer* Ver-1.19. A região da sequência U6 em negrito representa o éxon; circulada representa local de *splicing*, e as demais representam íntrons. A identidade molecular à sequência U6 é representada por ponto, e ausência, por hífen. Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), U71 (UFRGS 881971, acesso HQ910519), Trigo (*Triticum aestivum* L., acesso AY747600)..... 67
16. Comparação do tamanho de fragmento amplificado pelos pares de *primers* Ver-1.1 e Ver-1.19 do gene *Vrn1* dos genitores de aveia e do genótipo de trigo (AY747600). Os números dentro dos retângulos correspondem ao número de bases de cada segmento de DNA. Os retângulos brancos representam íntrons, e os retângulos pretos e cinzas representam éxons. Na figura superior e inferior, os retângulos cinzas representam regiões exônicas não amplificadas. A linha cinza separa as sequências do gene *Vrn1* das espécies de aveia e trigo..... 68
17. Alinhamento das sequências da região amplificada pelo par de *primers* AM87 dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605. A sequência em negrito representa a região microssatélite do marcador AM87. A identidade molecular à primeira sequência (U8a) é representada por ponto, e ausência de alinhamento é representada por hífen. Os quadrados representam *indel* entre as sequências alinhadas. Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), “a” (150 bases), “b” (152 bases)..... 69

1 INTRODUÇÃO

A aveia (*Avena sativa* L.) é um cereal de excelente valor nutritivo. Dentre os cereais disponíveis à dieta humana, a aveia destaca-se pela qualidade de proteínas e pelo elevado conteúdo de fibras solúveis “beta-glicanas”, as quais apresentam efeito positivo na redução do nível glicêmico e colesterol.

De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura), a produção mundial de aveia é de aproximadamente 24 milhões de toneladas anuais, cultivadas em uma área aproximada de 10 milhões de hectares. Todavia, a produção global de aveia tem diminuído ao longo das últimas décadas, incluindo os maiores produtores como Rússia, Canadá, Austrália e Polônia. Esta tendência de queda pode ser explicada pela redução da produção de grãos de aveia para ração, em especial para cavalos, e pela substituição da aveia por espécies mais rentáveis economicamente, como soja e milho no hemisfério Norte, onde são cultivadas na estação da primavera-verão. Por outro lado, a produção, produtividade e área cultivada com aveia no Brasil tem mostrado uma tendência ascendente e sustentável ao longo das últimas décadas.

Embora a exploração agrícola da aveia no Brasil seja recente, o país é o maior produtor de grãos da América Latina, onde a cultura tem ganhado importância nos últimos anos com a implantação e adoção do sistema de semeadura direta pelos produtores. Além disso, a aveia contribui para uma maior sustentabilidade e qualidade dos sistemas agrícolas, especialmente por

representar uma alternativa na rotação de culturas durante a estação de crescimento de inverno, diminuindo a ocorrência de pragas e moléstias.

A ocorrência do florescimento no momento ideal, dentro da estação de crescimento das plantas, representa um dos principais fatores de adaptação das espécies cultivadas. A transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva deve coincidir com condições ambientais que potencializem a máxima fertilidade das plantas. Assim, a definição do potencial de rendimento das plantas está relacionada com a maior quantidade de flores férteis. Sinais ambientais, como fotoperíodo e temperatura do ar, indicam aos cereais a melhor época para o florescimento, na qual os riscos de perda devido ao frio ou calor excessivo, indisponibilidade de água, entre outros fatores, são minimizados.

Entretanto, pesquisas ainda são necessárias para um maior entendimento do florescimento em aveia. As principais abordagens científicas deverão envolver a caracterização de mecanismos de herança genética que controlam o caráter florescimento, o entendimento de como os sinais ambientais participam na expressão do caráter florescimento e a identificação de genes envolvidos nas rotas do florescimento em aveia. Estes conhecimentos permitirão estabelecer um modelo genético e molecular avançado do florescimento em aveia, contribuindo para aumentar a eficiência na seleção de genótipos com melhor adaptação pelos programas de melhoramento genético.

Desta forma, os principais objetivos deste trabalho foram:

- i) analisar fenotipicamente uma população de linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento de genitores contrastantes para o caráter florescimento em diferentes épocas e anos;
- ii) clonar, sequenciar e caracterizar sequências de aveia associadas ao gene de vernalização *Vrn1*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Introdução

A sincronização do florescimento com os sinais ambientais é um fator crítico de adaptação, a qual visa maximizar o sucesso reprodutivo das plantas (Amasino, 2010). Apesar da identificação de um grande número de espécies vegetais, poucas espécies são empregadas pelo homem na agricultura e na alimentação humana. Desta forma, existe a necessidade de adequar o florescimento (entre outras características) das espécies cultivadas em diferentes ambientes de cultivo. O desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a cada região produtora vem sendo realizado com sucesso pelos programas de melhoramento genético de plantas (Turner *et al.*, 2005).

Dentre as espécies cultivadas, a aveia branca (*Avena sativa* L.) é de grande importância em todo o mundo, e é utilizada na alimentação humana e animal (Murphy & Hoffman, 1992). A aveia é uma espécie autógama, a qual exibe 95% ou mais de autofecundação natural, alohexaploide ($2n = 6x = 42$), originada a partir da agregação dos genomas diploides AA, CC e DD, de origem Mediterrânea, e se adapta a uma grande variedade de ambientes (Rines *et al.*, 2006; Loskutov, 2008). No Hemisfério Sul, o cultivo estende-se desde a latitude de 21° (Brasil) até 45° Sul (Nova Zelândia), enquanto que no Hemisfério Norte, a aveia é encontrada desde 19° (México) até 65° Norte (Finlândia). No entanto, a produção de aveia

concentra-se entre as latitudes 23° e 38° Sul e entre 35 e 55° Norte (Murphy & Hoffman, 1992).

No Sul do Brasil, a área cultivada com aveia aumentou nas últimas décadas, e o estado do Rio Grande do Sul é o principal produtor, sendo responsável por 64% da área de aveia cultivada, de acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2015). Em ambientes subtropicais, como no Sul do Brasil, onde dois cultivos podem ser realizados em um mesmo ano, a aveia desempenha um papel importante no sistema de manejo das lavouras. Ainda, a aveia permite o estabelecimento e manutenção do sistema plantio direto e representa uma ótima opção para a produção de grãos em sucessão com a cultura da soja (Locatelli *et al.*, 2008; Federizzi *et al.*, 2015).

Entretanto, o desenvolvimento contínuo de cultivares de aveia melhores adaptadas às diversas regiões de cultivo requer a compreensão dos mecanismos genéticos, fisiológicos e moleculares do florescimento em resposta aos sinais ambientais. Embora, muitos fatores genéticos e ambientais envolvidos na expressão do florescimento foram identificados e caracterizados nas últimas décadas, o controle do florescimento não está totalmente elucidado na maioria das espécies vegetais cultivadas (Zheng *et al.*, 2013). “Como o florescimento pode ser controlado?” está na lista das 100 perguntas mais importantes a serem investigadas nas próximas décadas pela pesquisa científica da área vegetal (Grierson *et al.*, 2011).

2.2 Principais fatores que influenciam o florescimento

O florescimento ocorre em resposta à interação dos sinais ambientais, como comprimento do dia e temperatura, e dos sinais endógenos da própria planta, como duração do período da fase juvenil, energia livre disponível para o

florescimento e nível de giberelina (Teotia & Tang, 2015). A Figura 1 apresenta um modelo resumido das principais rotas envolvidas no controle do florescimento na espécie modelo *Arabidopsis thaliana*.

A partir desse modelo, é possível observar que o relógio circadiano participa conjuntamente com a rota de resposta ao fotoperíodo na regulação do florescimento (López *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005). O relógio circadiano é um mecanismo endógeno de mensuração do tempo da planta, o qual apresenta um ciclo de aproximadamente 24 horas, regulando a transcrição de diversos genes. Dessa forma, o relógio circadiano regula aspectos fisiológicos de crescimento e de desenvolvimento da planta, como também, integra as respostas aos sinais ambientais (McWatters & Devlin, 2011).

A regulação da resposta ao fotoperíodo sincronizada com o ritmo do relógio circadiano das plantas resulta no aumento da expressão de genes promotores do florescimento, como o gene *CONSTANS (CO)*, apenas em condições indutivas de fotoperíodo longo (López *et al.*, 2001). Na Figura 1, também é possível observar três genes integradores das rotas de resposta no controle do florescimento: dois promotores, denominados *FLOWERING LOCUS T (FT)* e *SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO (SOC)*, e um repressor, denominado *FLOWERING LOCUS C (FLC)*.

O gene *FT* codifica uma proteína do tipo inibidora de quinase-RAF (Kardailsky *et al.*, 1999). Esta proteína está presente em diversos organismos eucariotos, e participa de processos celulares envolvidos na diferenciação, ciclo, apoptose e migração (movimento de células principalmente para a formação de novos tecidos) (Andrés & Coupland, 2012). Já os genes *SOC* e *FLC* codificam proteínas do tipo “MADS-box” (Michaels & Amasino, 1999; Lee *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009b). Proteínas MADS-box representam uma importante família de

fatores de transcrição, a qual participa na expressão de genes que desempenham funções cruciais no desenvolvimento das plantas. Entre estas funções, proteínas MADS-box estão diretamente envolvidas na determinação do órgão a ser desenvolvido em um meristema da planta (vegetativo ou reprodutivo), como também, na diferenciação dos órgãos florais (Hemming & Trevaskis, 2011).

A transcrição do gene *FT* em *Arabidopsis thaliana* é induzida pela proteína CONSTANS (CO), sob condições de fotoperíodo longo, em tecidos foliares da planta (Tiwari *et al.*, 2010). Após a proteína FT ser sintetizada nas folhas, FT desloca-se para o meristema apical pelos vasos do floema. Inicialmente, a proteína móvel entre diferentes tecidos da planta, promotora do florescimento e induzida sob condições de fotoperíodo longo, foi denominada de “florigeno” (King & Zeevaart, 1973). Apenas em estudos recentes, foi demonstrado que o florigeno é o produto codificado pelo gene *FT* (Huang *et al.*, 2005).

No meristema apical, a proteína FT interage com o fator de transcrição do tipo zíper de leucina (domínio bZIP), codificado pelo gene *FLOWERING LOCUS D* (*FD*), formando um complexo protéico, o qual ativa a expressão por cascata de outros genes do florescimento (Abe *et al.*, 2005). A transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva é um evento irreversível, devido à indução de múltiplas rotas bioquímicas e o envolvimento de um grande número de genes no controle do florescimento (Amasino, 2010).

O gene *FT* já foi identificado em um grande número de espécies angiospermas, como cevada (Yan *et al.*, 2006), ervilha (Hecht *et al.*, 2005), arroz (Higgins *et al.*, 2010); batata (Navarro *et al.*, 2011), girassol (Blackman *et al.*, 2010), entre outras. Apesar dos diferentes ambientes de adaptação de cada espécie, as funções do gene *FT* como integrador das rotas de resposta e promotor do florescimento são conservadas (Andrés & Coupland, 2012). Entretanto,

dependendo da espécie, sinais distintos de fotoperíodo (curto ou longo) induzem o gene *FT*. Em girassol, tanto dias curtos como dias longos promovem a transcrição do gene *FT* (Blackman *et al.*, 2010), enquanto que em cevada, apenas dias longos (Yan *et al.*, 2006). Portanto, os genes promotores de *FT* regulados pelo fotoperíodo são os genes responsáveis pela variação de resposta ao fotoperíodo existente entre as espécies (Andrés & Coupland, 2012).

Um dos primeiros genes induzidos pelo complexo FT-FD no meristema apical é o gene *SOC*. Em *A. thaliana*, a expressão do gene *SOC* é observada no meristema apical 12 horas após a exposição das plantas a uma condição de fotoperíodo longo (Borner *et al.*, 2000). A expressão do gene *SOC* induz genes diretamente envolvidos no desenvolvimento dos órgãos florais (Lee *et al.*, 2008). O gene *SOC*, além de promover genes envolvidos na diferenciação dos órgãos florais, também integra outras duas rotas de resposta na determinação do florescimento: da giberelina (Moon *et al.*, 2003) e da juvenilidade (Wang *et al.*, 2009a).

O hormônio giberelina, de acordo com os resultados de Moon *et al.* (2003), promove aumento na taxa de transcrição do gene *SOC*, induzindo assim, o florescimento. Já o período de juvenilidade é regulado principalmente por pequenas moléculas de RNA não codificantes denominadas microRNAs, como miRNA156 e miRNA172 (Wang *et al.*, 2009a). Estes microRNAs regulam a família de genes *SPL* (*Squamosa Promoter-binding Protein Like*), os quais estão envolvidos na regulação do gene *SOC* (Jung *et al.*, 2012).

As rotas de resposta autônoma e à vernalização são integradas pelo gene *FLC* (Figura 1). Este gene reprime tanto a expressão do gene *FT*, quanto do gene *SOC* (Helliwell *et al.*, 2006). Na ausência de períodos de baixas temperaturas

(vernalização) e na ausência da expressão de genes da rota autônoma, o gene *FLC* impede a ocorrência do florescimento (Michaels & Amasino, 2001).

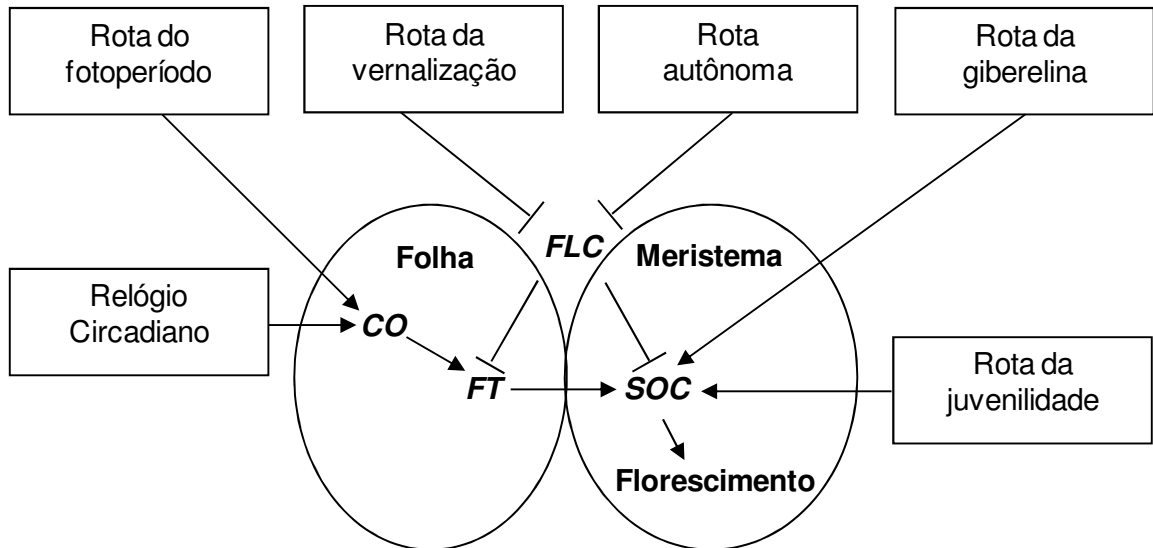


FIGURA 1. Modelo das principais rotas envolvidas no controle do florescimento em *Arabidopsis thaliana*. Flechas e “T” invertidos indicam indução e repressão, respectivamente. Legenda: *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), *CO* (*CONSTANS*), *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), *SOC* (*SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO*). Figura adaptada de Teotia & Tang (2015).

De maneira oposta ao gene *FT*, o gene *FLC*, identificado e caracterizado em *Arabidopsis thaliana*, não está conservado amplamente nas espécies de plantas. Genes com similaridade de nucleotídeos ao gene *FLC* já foram identificados em espécies monocotiledôneas, porém, estes não desempenham a mesma função do que em *A. thaliana* (Milec *et al.*, 2014).

Apesar dos cereais de inverno também apresentarem um repressor do florescimento, que é reprimido pela vernalização (como o gene *FLC*), os repressores do florescimento de *Arabidopsis* e cereais de inverno não são proteínas relacionadas estruturalmente. As angiospermas diversificaram há algumas centenas de milhões de anos, em uma era, na qual não existia temperaturas de inverno, e os continentes ainda estavam unidos (Soltis *et al.*, 2008). Subsequentemente, mudanças climáticas e a deriva continental

proporcionaram novos ambientes, nos quais a resposta à vernalização passou a ter valor adaptativo (Kim *et al.*, 2009).

Portanto, cada grupo de planta, proveniente de diferentes regiões de clima frio, desenvolveu um mecanismo de resposta à vernalização independente, mas com a mesma finalidade. Este tipo de evolução é denominado de “evolução convergente”. A rota de resposta à vernalização desenvolvida por cada grupo de plantas sobrepôs a rota de resposta ao fotoperíodo, já existente antes da diversificação das angiospermas (Amasino, 2010).

A expressão de genes envolvidos no florescimento pode ser regulada em nível pós-transcricional, via eventos de *splicing* alternativo que ocorrem durante o processamento do RNA, como também, por RNAs de interferência (Srikanth & Schmid, 2011; Teotia & Tang, 2015). A ocorrência desses mecanismos de regulação gênica, associada à existência de múltiplas rotas bioquímicas no controle do florescimento justifica a grande plasticidade observada para o caráter florescimento nos mais variados ambientes. Conseqüentemente, isto permite a produção de sementes em uma ampla variedade de condições ambientais e garante a sobrevivência das espécies de planta (Taiz & Zeiger, 2010).

A contribuição de cada rota de resposta para o florescimento apresentada na Figura 1, pode variar entre espécies, como também entre diferentes genótipos da mesma espécie. As condições ambientais do centro de origem e de diversidade de cada genótipo contribuíram na determinação do grau de importância de cada fator envolvido no florescimento (Fjellheim *et al.*, 2014). Por exemplo, em espécies do gênero Brassica, a resposta à vernalização varia amplamente entre espécies e genótipos da mesma espécie. Esta variação está diretamente relacionada com os diferentes centros de diversidade localizados entre o Norte e Sul da Ásia (Guo *et al.*, 2014). Em aveia, os sinais ambientais de maior influência na determinação do

florescimento são o fotoperíodo, a vernalização e a soma térmica (Locatelli *et al.*, 2008).

2.3 Ocorrência do florescimento em resposta ao fotoperíodo

O termo fotoperiodismo foi introduzido por Garner & Allard (1920) e é definido pela resposta ao comprimento do dia, a qual promove melhor adaptação às mudanças sazonais. O florescimento das plantas, no momento adequado da estação de crescimento, é uma das características que promove melhor adaptação das espécies, e pode ser induzido pelas condições de fotoperíodo. Todavia, respostas diferenciadas ao fotoperíodo são observadas entre as plantas, permitindo classificá-las em três grupos distintos: (i) plantas de dia longo, as quais florescem apenas, ou mais rapidamente, quando expostas a um fotoperíodo longo; (ii) plantas de dia curto, as quais florescem apenas, ou mais rapidamente, quando expostas a um fotoperíodo curto e (iii) plantas de dia neutro (insensíveis ao fotoperíodo), as quais florescem independente das condições de fotoperíodo (Garner & Allard, 1920).

Entretanto, cada espécie ou genótipo da mesma espécie, apresenta um fotoperíodo crítico distinto (Taiz & Zeiger, 2010; Friedman & Willis, 2013). O fotoperíodo crítico é o número de horas de luz, o qual as plantas reconhecem o comprimento do dia limite entre um dia curto e um dia longo (Taiz & Zeiger, 2010). Portanto, caso duas espécies de plantas, classificadas como plantas de dia longo, a primeira com fotoperíodo crítico de 12 horas, a segunda, de 14 horas, fossem expostas a um fotoperíodo de 13 horas, apenas a primeira espécie estaria percebendo o estímulo de fotoperíodo longo.

Uma mesma espécie, independente do genótipo, é classificada em um mesmo grupo de resposta ao fotoperíodo (Garner & Allard, 1920). Os cereais de

inverno, assim como a beterraba e as espécies modelo *Arabidopsis thaliana* e *Brachypodium distachyon* são classificadas como plantas de dia longo (Ream *et al.*, 2012). Já as gramíneas de verão, como o arroz (*Oryza sativa* L.), são classificadas como plantas de dia curto (Hayama *et al.*, 2003). Entretanto, a exigência de condições indutivas de fotoperíodo para o florescimento pode variar entre genótipos da mesma espécie, de ausente, facultativa à obrigatória (Jarillo *et al.*, 2008).

Em cereais de inverno, como trigo, cevada e aveia, os programas de melhoramento visam o desenvolvimento de cultivares neutras ao fotoperíodo. Desta forma, o ciclo da planta é independente ao estímulo do comprimento do dia, o que possibilita, em geral, uma redução no ciclo vegetativo dos cereais de inverno. Conseqüentemente, permite que a semeadura dos cultivos de verão ocorra no momento recomendado (Hucl, 1995; Federizzi *et al.*, 2015). Além disso, cultivares neutras apresentam maior adaptação às condições de ambiente tropical. A insensibilidade ao fotoperíodo permitiria a expansão da área cultivada de espécies como trigo, cevada e aveia para regiões tropicais de cultivo.

2.4 Ocorrência do florescimento em resposta à vernalização

Plantas originadas de regiões com temperaturas baixas, geralmente possuem a rota de resposta ao fotoperíodo bloqueada pela exigência de satisfação do requerimento de vernalização (Amasino, 2010). Vernalização é o processo, no qual a planta adquire competência floral somente após uma exposição prolongada de temperaturas baixas durante o inverno, ou quando plantas jovens são submetidas a um tratamento artificial de frio (Chouard, 1960). Esta exposição ao frio deve ser realizada em plantas metabolicamente ativas e atingir o ápice da parte aérea (Chouard, 1960; Lang, 1965). O requerimento da

vernalização para a competência floral garante a ocorrência do florescimento na estação da primavera, a qual apresenta condições mais favoráveis ao desenvolvimento das estruturas reprodutivas das plantas (Amasino, 2004).

A satisfação do requerimento de vernalização é alcançada de forma gradual, pois depende dos fatores intensidade, constância e duração das baixas temperaturas (Michaels & Amasino, 2000). Além disso, temperaturas altas, entre 30 a 40 °C, logo após a vernalização, podem converter esta resposta (Lang, 1965). Entretanto, o grau de influência dos fatores que afetam a vernalização é dependente da espécie, como também do genótipo da mesma espécie. Os cereais de inverno podem ser vernalizados até -6 °C, onde nesta temperatura, o metabolismo de sementes ainda pode estar ativo, devido à presença de moléculas criogênicas (Bernier *et al*, 1981; Gusta & Wisniewski, 2013). Em oliveira (*Olea europaea* L.), originária de regiões menos frias, a vernalização é induzida por temperaturas próximas a 13 °C (Hackett & Hartmann, 1967). A exposição de um a três meses de baixas temperaturas entre 1 °C a 7 °C geralmente é suficiente para satisfazer o requerimento de vernalização na maioria das espécies que apresentam este requerimento (Michaels & Amasino, 2000).

A intensidade de temperaturas baixas durante o inverno é um fator importante na determinação da necessidade e do grau de requerimento de vernalização das espécies vegetais. Em acessos de aveia silvestre, o grau de requerimento de vernalização foi associado à distribuição geográfica. As regiões de maior altitude e latitude apresentaram acessos com os maiores graus de requerimento de vernalização (Loskutov, 2001).

Ajustar o nível adequado de requerimento de vernalização de culturas de inverno cultivadas em regiões subtropicais é um dos desafios dos melhoristas (Nava *et al.*, 2012). O clima subtropical apresenta grande flutuação de

temperaturas entre anos, apesar de possuir estações definidas (Trewartha & Horn, 1980). Nesse ambiente, culturas de inverno com alto grau de requerimento de vernalização podem não florescer, ou florescer tardiamente, sem um período adequado de desenvolvimento na fase reprodutiva, principalmente em anos mais quentes. Por outro lado, culturas de inverno com baixo requerimento de vernalização podem florescer em um período de maior risco de ocorrência de baixas temperaturas, prejudiciais ao desenvolvimento da fase reprodutiva, principalmente em anos mais frios (Pigliucci & Marlow, 2000).

Em algumas espécies, o requerimento de vernalização suprimido pela exposição prévia ao fotoperíodo curto à exposição de fotoperíodo longo. Isso é verificado em genótipos de *Triticum monococcum* L. (Dubcovsky *et al.*, 2006), de *Brachypodium distachyon* (Ream *et al.*, 2014), assim como para a maioria das gramíneas de inverno da subfamília Festucoideae (Heide, 1994).

Entretanto, esta substituição da vernalização pelo fotoperíodo curto é restrita a genótipos classificados como plantas de dia longo quanto à resposta ao fotoperíodo. O requerimento de exposição ao fotoperíodo curto seguido do fotoperíodo longo para a indução do florescimento é uma característica ancestral, perdida no processo de domesticação e melhoramento das espécies cultivadas. As variedades modernas de trigo não apresentam mais essa característica e são classificadas apenas como plantas de dia longo (Dubcovsky *et al.*, 2006).

2.5 Bases genéticas e moleculares do fotoperíodo

Em *Arabidopsis thaliana*, o gene *CONSTANS* (*CO*), induzido pelo fotoperíodo longo, é promotor do gene *FT*, como demonstrado na Figura 1. O gene *CONSTANS* (*CO*) codifica uma proteína “zinc-finger”, que contém dois boxes “B”, e domínios CO, CO-LIKE, e TOC1 (domínio CCT) (Putteril *et al.*, 1995).

Por ser regulado tanto pelo relógio circadiano, quanto pelo comprimento do dia, a regulação da expressão do gene *CO* pode ocorrer em nível transcricional e pós-traducional. A regulação realizada por mais de uma fase aumenta a concentração da proteína *CO* apenas em dias longos (López *et al.*, 2001).

Na fase de regulação transcricional do gene *CO*, o gene *FLAVIN KELCH F BOX (FKF1)*, e a proteína planta específica *GIGANTEA (GI)* participam na regulação da transcrição de *CO*. O gene *FKF1* codifica uma proteína com domínio capaz de perceber a luz (Song *et al.*, 2012). Após esta percepção, a proteína *FKF1* liga-se com a proteína *GI*, e em dias longos, esta ligação induz a degradação de repressores transcricionais do gene *CO*, como os *CYCLING DOF FACTORS (CDFs)* (Sawa *et al.*, 2007).

Na fase pós-traducional de regulação, a marcação para degradação da proteína *CO* por um complexo de ubiquitina é reprimida pela presença de luz (Jang *et al.*, 2008). Ainda, em dias longos, ao final da tarde, a estabilidade de *CO* aumenta devido à ocorrência da interação direta entre a proteína *FKF1* e *CO* (Song *et al.*, 2012). Os genes *CO*, *GI* e *FKF1* são regulados pelo relógio circadiano, e a determinação da quantidade e estabilidade de *CO* depende da coincidência do pico de expressão daqueles genes com sinais externos indutivos, como de fotoperíodo longo (Andrés & Coupland, 2012).

Em arroz (*Oryza sativa* L.), o gene *HEADING DATE 1 (HD1)* apresenta ortologia ao gene *CONSTANS* de *Arabidopsis thaliana*. Além do gene *HD1*, dois ortólogos ao gene *FT* foram identificados em arroz, sendo eles: o *HEADING DATE 3a (HD3a)* e *RICE FT-LIKE 1 (RFT1)* (Higgins *et al.*, 2010). Entretanto, todos os três genes são induzidos pelo fotoperíodo curto, ao contrário do que ocorre em *A. thaliana*. Em dias longos, a proteína *HD1* liga-se a fitocromos, e reprime *HD3a* (Isawa *et al.*, 2002).

Em arroz, o gene *EARLY HEADING DATE 1 (EHD1)* também é promotor dos genes *HD3a* e *RFT1*. Em dias curtos, a proteína EHD1 induz os genes *HD3a* e *RFT1*, e em dias longos, *EHD1* é reprimido pelo gene *GRAIN NUMBER, PLANT HEIGHT AND HEADING DATE 7 (GHD7)*. O gene *GHD7*, além de influenciar o florescimento, participa no desenvolvimento dos componentes do rendimento, como número de grãos por panícula e estatura de plantas (Xue *et al.*, 2008). Em *Arabidopsis thaliana*, e em *Brachypodium distachyon* nenhum gene ortólogo ao *GHD7* foi identificado até o momento (Higgins *et al.*, 2010).

Espécies de cereais, como trigo e cevada, também apresentam ortólogos aos genes *FT* e *CO* de *A. thaliana*, denominados *VERNALIZATION 3 (Vrn3)* e *CONSTANS (CO)*, respectivamente (Nemoto *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2009). Em cereais, foi identificado que o gene *CO* é induzido pelo gene *PHOTOPERIOD 1 (Ppd1)* em condições de fotoperíodo longo. O gene *Ppd1* é regulado pelo relógio circadiano, e pertence à família de pseudogenes reguladores (*PRR*) (Turner *et al.*, 2005). Em trigo, uma deleção na região promotora do gene *Ppd1* tornou a expressão do gene independente da condição de fotoperíodo, promovendo o florescimento também em dias curtos (Distelfeld *et al.*, 2009). Genes da família *PRR* são encontrados em *A. thaliana*, e também são regulados pelo relógio circadiano, porém esses genes estão envolvidos em outros processos de desenvolvimento da planta. O gene *TOC1* de *A. thaliana*, um dos reguladores centrais do relógio circadiano, por exemplo, é um gene pertencente à família *PRR* (Higgins *et al.*, 2010).

Em diversos estudos, a determinação dos genes envolvidos na resposta ao fotoperíodo foi definida em experimentos sob condições ambientais controladas. No entanto, na natureza as plantas são expostas a condições ambientais mais complexas, como por exemplo, a ocorrência de variação simultânea da

temperatura e fotoperíodo e, de mudança gradual no comprimento do dia durante a estação de crescimento. O estudo do florescimento em condições ambientais controladas pode mascarar a existência de outros genes importantes envolvidos em uma rota de resposta integrada aos diferentes sinais ambientais (Andrés & Coupland, 2012).

2.6 Bases genéticas e moleculares da vernalização

Em *Arabidopsis thaliana*, o gene *FLC* reprime o gene *FT* nas folhas, como também outros genes expressos no meristema apical envolvidos no florescimento. A vernalização reprime o gene *FLC*, o qual libera o potencial de expressão dos genes reprimidos (Michaels & Amasino, 1999). A proteína FRIGIDA (FRI) é um fator de transcrição zíper de leucina, necessário para que a taxa de transcrição do gene *FLC* ocorra de forma elevada. FRI agrega um complexo de proteínas, responsável em recrutar fatores modificadores de cromatina no gene *FLC*, tornando-o ativo (Choi *et al.*, 2011). A vernalização induz a outras alterações no nível de organização da cromatina, onde o gene *FLC* está localizado, tornando-o insensível ao complexo de FRI. Nestas condições, a expressão do gene *FLC* é reprimida, possibilitando a expressão de genes promotores do florescimento (Amasino, 2010).

A inativação do gene *FLC* pela mudança do estado da cromatina, promovida pela vernalização, é induzida pelos genes *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)* (Sung & Amasino, 2004) e *VERNALIZATION 2 (VNR2)* (Gendall *et al.*, 2001). O *VIN3* e *VRN2* aumentam de expressão em exposições prolongadas de frio (vernalização), e são responsáveis em atrair o complexo "POLYCOMB REPRESSOR COMPLEX" (PRC) na região do gene *FLC*. O complexo PRC promove três metilações na lisina 27 da histona 3 (H3K27) na

região do primeiro íntron do gene. Essa metilação é responsável em tornar o gene *FLC* inativo durante a vernalização. Após a vernalização, a expressão dos genes *VIN3* e *VRN2* é reprimida, porém a atividade do complexo PRC não é influenciada pela temperatura, e por esse motivo, continua a metilar a região do primeiro íntron do gene *FLC* (De Lucia *et al.*, 2008).

Os genes *VERNALIZATION 1 (VRN1)* (Sung & Amasino, 2004) e *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1)* (Sung *et al.*, 2006) são responsáveis em estabilizar as metilações promovidas pelo complexo PRC. O *VRN1* e o *LHP1* induzem outro tipo de metilação, na região H3K9 do gene *FLC*, responsável em manter as metilações H3K27 (Sung & Amasino, 2004; Sung *et al.*, 2006). Por esses mecanismos, o gene *FLC* é reprimido durante e após a vernalização, mesmo quando as plantas são expostas a temperaturas altas em um período posterior às temperaturas baixas de inverno (Choi *et al.*, 2011).

O termo “memória do inverno”, ou “memória epigenética” é empregado quando o gene *FLC* é reprimido permanentemente a partir do inverno (duração e intensidade de temperaturas baixas), até o fim do ciclo da planta adulta, através dos mecanismos epigenéticos (Gendall *et al.*, 2001; Sung & Amasino, 2004). No entanto, a memória epigenética do gene *FLC* é apagada nos tecidos germinativos durante a gametogênese. Na fase embrionária, o gene *FLC* é reativado, garantindo a necessidade de resposta à vernalização a cada geração. O mecanismo de como ocorre a deleção da memória epigenética no embrião, no entanto, ainda não está totalmente caracterizado (Choi *et al.*, 2009).

O mecanismo de percepção da duração da exposição ao frio também não está totalmente elucidado e nem como o gene *FLC* torna-se alvo das metilações (Amasino, 2010). Provavelmente, a indução rápida observada do transcrito anti-

senso do gene *FLC*, em condições de vernalização, possui alguma função em sinalizar a localização da metilação no gene *FLC* (Swiezewski *et al.*, 2009).

Em trigo e cevada, nenhum gene ortólogo ao gene *FLC* de *A. thaliana* foi identificado. Entretanto, o gene *VERNALIZATION 2* (*Vrn2*) em cereais desempenha função similar ao gene *FLC*, que é reprimir o principal gene promotor do florescimento, o *Vrn3* em cereais (Yan *et al.*, 2004).

O gene *Vrn2* em cereais não apresenta nenhuma identidade molecular ao gene com mesmo nome, *VRN2* em *A. thaliana*. Em cereais, o gene *Vrn2* produz uma proteína “CO-like”, e reprime o gene *Vrn3* em dias longos (Distelfeld *et al.*, 2009; Dubcovsky *et al.*, 2006). Em dias curtos, não há necessidade de reprimi-lo, pois o gene *Vrn3* somente é induzido em dias longos. Além do fotoperíodo, a vernalização também regula a expressão do gene *Vrn2*. Em plantas vernalizadas, o gene *Vrn2* é reprimido pela ativação do gene *VERNALIZATION 1* (*Vrn1*) (Yan *et al.*, 2003). Assim como o gene *Vrn2*, o gene *Vrn1* em cereais não apresenta nenhuma identidade molecular ao gene com mesmo nome, *VRN1* em *A. thaliana*.

O gene *Vrn1* produz uma proteína pertencente à família dos fatores de transcrição “MADS-box” e é ortólogo aos genes *APETALA 1*, *CAWLIFLOWER* e *FRUITFUL* de *A. thaliana* (Preston & Kellogg, 2007). Em *A. thaliana*, estes genes participam na identidade dos órgãos florais (Ferrándiz *et al.*, 2000). Em trigo e cevada, o gene *Vrn1*, além de desempenhar a mesma função dos genes ortólogos em *A. thaliana*, participa na resposta à vernalização (Trevaskis *et al.*, 2007).

A exposição ao frio induz mudanças na cromatina do gene *Vrn1*, as quais possibilitam a expressão do gene, e por consequência, a diminuição da expressão do gene *Vrn2* nas folhas. Ainda não foi determinado como o gene *Vrn1* reprime o gene *Vrn2*, e se existem outros genes, ou proteínas mediadoras da interação entre *Vrn1* e *Vrn2* (Chen & Dubcovsky, 2012). O gene *Vrn2* também regula o gene

Vrn1, mas em resposta ao fotoperíodo e não à vernalização. Em dias longos, *Vrn2* reprime *Vrn1* (Distelfeld *et al.*, 2009).

Assim como o gene *FLC* de *Arabidopsis thaliana*, o gene *Vrn1* dos cereais é regulado por mudança no estado da cromatina na região do primeiro íntron do gene, promovida pela vernalização (Oliver *et al.*, 2009). Antes da vernalização, o primeiro íntron está metilado na região H3K27 (mesma metilação responsável pela repressão do gene *FLC*). Temperaturas baixas iniciam o processo de acetilação das histonas H3 e H4 do gene *Vrn1*, liberando o potencial de expressão (Oliver *et al.*, 2013). Entretanto, ao contrário do que ocorre com o gene *FLC* em *A. thaliana*, o gene *Vrn1* está em um estado reprimido antes da vernalização, e genes do tipo “*VIN-like*” de trigo não contribuem para a mudança de cromatina do gene *Vrn1* (Oliver *et al.*, 2013).

A acetilação H3H4, necessária para a liberação da expressão de *Vrn1*, não é necessária para a indução do gene, sugerindo que outros locais do gene mediem a ativação pelo frio (Oliver *et al.*, 2013). No entanto, na região promotora do gene *Vrn1*, ainda não foram identificados sítios de regulação em resposta à vernalização (Distelfeld *et al.*, 2009). Para haver o potencial de expressão do gene *Vrn1* liberado permanentemente pela acetilação H3H4, é necessário um tempo mínimo de exposição a baixas temperaturas. Apesar de uma pequena exposição ao frio promover a expressão do gene *Vrn1*, apenas longas exposições mantêm elevada a expressão do gene após o tratamento de vernalização (Oliver *et al.*, 2013).

Em cereais, da mesma forma que em *Arabidopsis thaliana*, ainda não está elucidado como ocorre o mecanismo de sinalização do período e da ocorrência das baixas temperaturas, mas essa percepção é capaz de discriminar pequenas diferenças de temperatura. A expressão de *Vrn1* é mais elevada a 2°C do que a 4°C. Além disso, a rota de sinalização utilizada para genes de vernalização parece

ser a mesma utilizada para genes de aclimatação. Genes pertencentes tanto à rota de resposta à vernalização, quanto à aclimatação, apresentam regulação de transcrição por acetilação de histonas, sítios de ligação ao mesmo fator de transcrição, como também, perfil de expressão similar (Oliver *et al.*, 2013).

Em plantas vernalizadas expostas ao fotoperíodo longo, ocorre o aumento da expressão do gene *Vrn1* (Trevaskis *et al.*, 2003), a diminuição da expressão do gene *Vrn2* (Yan *et al.*, 2004), e o aumento da expressão do gene *CO* (Putterill *et al.*, 1995). O modelo de competição entre as proteínas *Vrn2* e *CO* pelo sítio de ligação da região promotora do gene *Vrn3* tem sido sugerido, pois as duas proteínas apresentam o mesmo domínio “CO”. Nessas condições, haverá uma maior concentração de *CO* em comparação à *Vrn2*, e isso promoverá o florescimento. Caso não haja vernalização, as duas proteínas vão estar presentes em alta concentração, diminuindo a indução do florescimento (Li *et al.*, 2011).

O gene *Vrn3*, após sua indução, ativa genes envolvidos na transição do florescimento, incluindo o gene *Vrn1*. Portanto, os genes *Vrn1* e *Vrn3* atuam de forma conjunta e coordenada para promover o florescimento em cereais (Distelfeld *et al.*, 2009). A eficiência de indução do gene *Vrn1* pelo gene *Vrn3* está associada ao gene *VERNALIZATION 4* (*Vrn4*), de cadeia de polipeptídeos ainda desconhecida (Kippes *et al.*, 2014). Os genes *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3* já foram clonados, e apresentam homólogos nos três genomas do trigo (Yan *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006), enquanto que o gene *Vrn4* ainda não foi clonado, e apresenta apenas uma cópia no genoma D do trigo (Yoshida *et al.*, 2010).

Em trigo, foi observado que o gene *Vrn1*, apesar de antecipar o florescimento das plantas em resposta a baixas temperaturas, não é essencial para a resposta à vernalização (Chen & Dubcovsky, 2012). Portanto, a diferença do florescimento de genótipos sensíveis em comparação com genótipos

insensíveis à vernalização pode ser devida tanto a variações na rota de resposta do gene *Vrn1*, quanto em outros genes, os quais também determinam a resposta à vernalização.

Em *Arabidopsis thaliana*, o gene *AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19)* foi identificado como atuante na resposta à vernalização independentemente do gene *FLC* (Hemming & Trevaskis, 2011). O gene *AGL19*, codifica uma proteína do tipo MADS-box, é induzido por baixas temperaturas e antecipa o florescimento. Porém, o gene *AGL19* apresenta mecanismo de regulação independente da regulação do gene *FLC* (Schonrock *et al.*, 2006). Portanto, assim como nos cereais, a diferença genética da resposta à vernalização entre genótipos de *A. thaliana* pode ser proveniente de genes envolvidos em rotas de resposta à vernalização independentes entre si.

2.7 Bases genéticas e moleculares da resposta ao fotoperíodo e à vernalização em *Brachypodium distachyon* e *Beta vulgaris*

A extensão da conservação das rotas de resposta ao fotoperíodo e à vernalização entre os cereais de inverno ainda não está completamente elucidada. Estudos sobre o florescimento em *Brachypodium distachyon*, espécie modelo para cereais de inverno, estão sendo conduzidos para investigar o grau de conservação dessas rotas de resposta entre as gramíneas (Ream *et al.*, 2014).

A espécie *B. distachyon* apresenta possíveis ortólogos aos genes *CO*, *Gl*, *PRR*, *Vrn1* e *Vrn3 (FT)* de gramíneas e de *A. thaliana*. Entretanto, apenas a função dos genes *Vrn1* e *Vrn3* foi determinada, e é similar à função dos respectivos genes nas gramíneas de inverno (Higgins *et al.*, 2010). Em *B. distachyon*, nenhum gene ortólogo foi identificado ao gene *Vrn2* de cereais de inverno. O gene de maior similaridade de nucleotídeos ao gene *Vrn2*, foi denominado de *VRN2L* e

parece estar envolvido no processo de aclimatação, e não à resposta à vernalização. O nível de expressão de *VRN2L* é apenas um pouco menor em plântulas de *B. distachyon* vernalizadas em relação a não vernalizadas, e após 12 dias de tratamento de frio, esta diferença não é mais observada (Ream *et al.*, 2014).

Na espécie bienal *Beta vulgaris* (beterraba) ortólogos funcionais aos genes *FLC*, *CO* e *FT* de *A. thaliana* foram identificados (Salah *et al.*, 2012). Entretanto, apenas o mecanismo de resposta ao fotoperíodo é similar ao que ocorre em *A. thaliana*. A resposta à vernalização difere e é governada por três genes: *Beta vulgaris* *BOLTING TIME CONTROL 1* (*BvBTC1*), *Beta vulgaris* *FLOWERING LOCUS T 1* (*BvFT1*) e *Beta vulgaris* *FLOWERING LOCUS T 2* (*BvFT2*). Os três genes pertencem à família gênica “PEBP” (proteína de ligação fosfatidiletanolamina) (Chardon & Damerval, 2005). O gene *BvFT2* é o ortólogo de *FT*, enquanto o *BvFT1*, o de *FLC*. Em temperaturas baixas, *BvFT1* (*FLC*) diminui de expressão, e deixa de reprimir o gene *BvFT2* (*FT*). No entanto, a expressão do gene *BvFT1* é mantida em baixos níveis após a vernalização pelo estímulo de fotoperíodo longo (Pin *et al.*, 2010).

Entretanto, a variação natural do florescimento em resposta à vernalização em beterraba está associada ao alelo *BvBTC1*, homólogo a genes *PRR* de *A. thaliana* e de cereais. O alelo dominante de *BvBTC1* diminui o nível de expressão de *BvFT1* (*FLC*), independente do tratamento de vernalização. Já o alelo recessivo está associado ao fenótipo de sensibilidade à vernalização, pois é induzido apenas na presença de frio, reprimindo o gene *BvFT1* (*FLC*). A diferença molecular entre os dois alelos ainda não é conhecida (Pin *et al.*, 2012). A Figura 2 apresenta um resumo dos principais mecanismos moleculares da resposta ao fotoperíodo e à vernalização propostos de cada grupo de plantas discutidos acima.

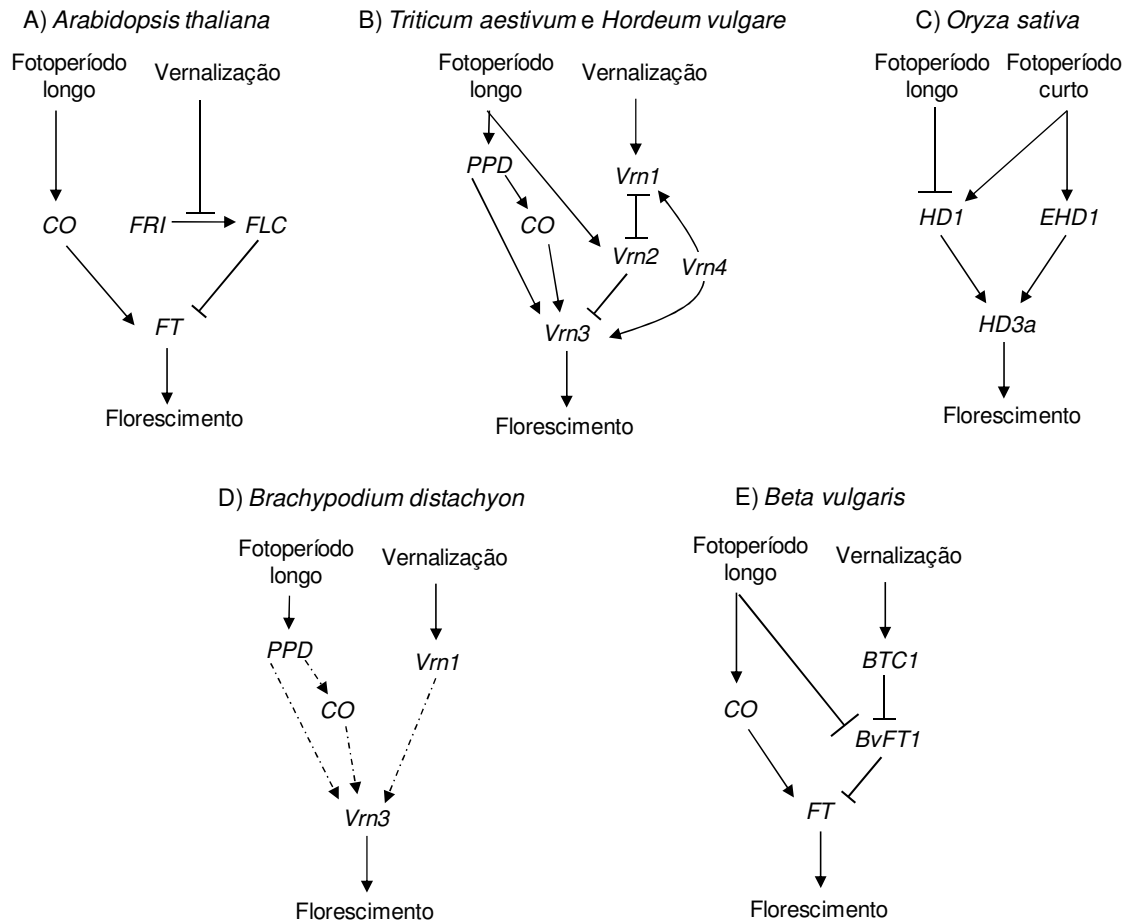


FIGURA 2. Modelo de regulação gênica do florescimento em resposta à vernalização e ao fotoperíodo de cinco grupos de planta. A) *Arabidopsis thaliana*; B) *Triticum aestivum* e *Hordeum vulgare*; C) *Oryza sativa*; D) *Brachypodium distachyon* e E) *Beta vulgaris*.

2.8 Determinação do florescimento em resposta ao fotoperíodo e à vernalização em aveia hexaploide

As espécies silvestres de aveia são geralmente classificadas como plantas de dia longo, mas podem apresentar variação quanto ao grau de necessidade de exposição ao fotoperíodo indutivo (longo), de facultativa à obrigatória. Além disso, a exigência de um fotoperíodo considerado indutivo também pode variar dependendo da espécie de aveia, entre neutra a dia longo (Loskutov, 2001).

O gene de insensibilidade ao fotoperíodo, denominado *Di1*, foi identificado como responsável pela precocidade em genótipos canadenses de aveia

(Sampson & Burrows, 1972). Em um mapeamento molecular de populações de aveia de origem brasileira, um QTL de grande efeito sobre o florescimento foi identificado em uma região homóloga ao gene *Di1* (Locatelli *et al.*, 2006). Além disso, o QTL identificado apresentou homologia aos genes *HD1* (*HEADING DATE 1*) de arroz e *CO* (*CONSTANS*) de *A. thaliana*, promotores do florescimento em resposta ao fotoperíodo. Outros três QTL também foram identificados em aveia, responsáveis em antecipar o florescimento pela insensibilidade ao fotoperíodo, ou pela precocidade *per se* das plantas (Locatelli *et al.*, 2006).

Além de responder ao fotoperíodo, um grande número de genótipos de aveia também responde à vernalização (Locatelli *et al.*, 2008; Nava *et al.*, 2012). A maioria destes genótipos apresenta resposta facultativa à vernalização, e pode ser vernalizada até temperaturas próximas a 10°C (Sorrells & Simmons, 1992).

Apesar de atingirem a competência floral, mesmo na ausência de vernalização (resposta facultativa), os genótipos de aveia podem ser classificados em cinco grupos distintos em relação ao grau de requerimento de vernalização: primaveris, os quais não respondem a vernalização; intermediários, os quais respondem rapidamente a um tratamento de vernalização; invernaís do tipo I, os quais respondem somente após um mês de vernalização; invernaís do tipo II, os quais respondem somente após 50 dias de vernalização; e inflexíveis, os quais não florescem mesmo após 50 dias de vernalização (Sorrells & Simmons, 1992). Assim como para algumas espécies de gramíneas de inverno, em alguns genótipos de aveia, a vernalização pode ser substituída pela exposição das plantas à um fotoperíodo curto previamente à exposição à um fotoperíodo longo (Locatelli *et al.*, 2008; Nava *et al.*, 2012).

Sequências com alta similaridade ao gene *Vrn3* de trigo e cevada e ao gene *HD3a* de arroz foram obtidas em aveia. Os genes *Vrn3* de trigo e *HD3a* de

arroz são ortólogos ao gene *FT* de *A. thaliana*, o qual é um dos principais promotores do florescimento. O gene *Vrn3* foi sequenciado e mapeado em três populações diferentes de linhagens recombinantes de aveia, em regiões cromossômicas colineares (Nava *et al.*, 2012).

Sequências de aveia com alta similaridade ao gene *Vrn1* de trigo e cevada, um dos principais genes envolvidos na resposta à vernalização, também foram obtidas. Já para *Vrn2*, sequências obtidas de genótipos brasileiros de aveia, demonstraram que esse gene foi interrompido por um retrotransposon (Nava *et al.*, 2012). A ausência de alelos funcionais do gene *Vrn2* deve promover maior adaptação de genótipos de aveia, quando cultivados em ambientes subtropicais. Por outro lado, a presença de alelos funcionais do gene *Vrn2* nestes genótipos, aumentaria o requerimento de vernalização, o que impediria o florescimento em um momento adequado nas estações de cultivo em ambientes subtropicais.

Desta forma, a maior compreensão da variação fenotípica do florescimento em resposta ao fotoperíodo e à vernalização, associada com a identificação de genes e/ou alelos determinantes do florescimento, possibilitarão a seleção de genótipos de aveia com melhor adaptação às diversas condições de cultivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise fenotípica do florescimento em aveia

3.1.1 Material vegetal

Uma população de 108 linhagens recombinantes de aveia hexaploide, derivada do cruzamento entre os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605, foi empregada neste estudo. Os genitores foram desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Aveia, o qual pertence à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A genealogia do genitor UFRGS 8 é “OA338 // X2682-1”, e a genealogia do genitor UFRGS 930605 é “UFRGS 15 // UFRGS 881920”. A escolha dos genitores para o desenvolvimento da população de linhagens recombinantes considerou a diferença dos mesmos para o caráter florescimento.

O genitor UFRGS 8 é considerado insensível tanto ao fotoperíodo quanto à vernalização, enquanto que o genitor UFRGS 930605 é sensível a ambos os sinais ambientais de fotoperíodo e vernalização. Desta forma, os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 exibem ciclo vegetativo precoce e tardio, respectivamente. A população de linhagens recombinantes foi desenvolvida pelo método SSD (*single-seed descent*) modificado até a geração de autofecundação F₆ sem seleção.

3.1.2 Condução dos experimentos

Os experimentos de campo foram conduzidos na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS, localizada no município de Eldorado do Sul, RS. A EEA está situada na região climática da Depressão Central, na latitude de 30° Sul, e na longitude de 51° Oeste. A área apresenta relevo de ondulado a suavemente ondulado, e vegetação de campos mistos. Os solos situam-se em duas unidades de mapeamento predominantes: São Jerônimo, com argissolos vermelhos distróficos; e Arroio dos Ratos, com argissolos distróficos típicos. Há também predominância de solos mal drenados em áreas planas (Bergamaschi *et al.*, 2013).

O material vegetal descrito anteriormente foi avaliado em quatro experimentos, nos anos de 2013 e 2014. Em cada ano de avaliação, as linhagens recombinantes e os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 foram avaliados em duas diferentes épocas de semeadura. A primeira época de semeadura, denominada de “semeadura do cedo”, foi realizada no dia 06 de junho, e 04 de junho, para os anos de 2013 e 2014, respectivamente. A segunda época de semeadura, denominada de “semeadura do tarde”, foi realizada no dia 20 de agosto e 19 de agosto, nos anos de 2013 e 2014, respectivamente.

Dentro de cada época de semeadura nos dois anos de avaliação, foi empregado o delineamento experimental de blocos ao acaso, com duas repetições. Cada genótipo, em cada uma das duas repetições, foi semeado de forma mecanizada, em linha dupla no campo, com espaçamento de 0,20 metros entre linhas simples do mesmo genótipo, e 0,40 metros entre linhas-duplas de genótipos diferentes, e todas as linhas com 2,0 metros de comprimento. Durante a semeadura, cada linha dupla recebeu a quantidade de sementes produzidas por uma panícula individual.

A adubação de base foi composta de 300 kg ha⁻¹ da fórmula 5-30-15 de N-P-K. Duas adubações nitrogenadas em cobertura foram realizadas, próximo à quarta e à sétima folha, respectivamente, na dose de 90 kg ha⁻¹ de uréia em cada aplicação. O controle de plantas daninhas foi realizado manualmente e doenças fúngicas foram controladas com o fungicida Tebuconazole, na dose de 750 mL ha⁻¹, sempre que necessário.

3.1.3 Dados meteorológicos

Dados da temperatura média diária da estação meteorológica de Porto Alegre, RS correspondentes aos anos avaliados, e ao período das estações de crescimento das duas épocas de semeadura, foram utilizados para obtenção da estimativa da soma térmica do ar. Esta estação meteorológica corresponde à estação mais próxima em funcionamento durante todo o período de condução dos experimentos, uma vez que a Estação Experimental Agrônômica da UFRGS não dispunha de uma estação ativa de coleta de dados meteorológicos. O Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP), disponível no site www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/ foi acessado para a obtenção dos dados da estação meteorológica de Porto Alegre.

A estimativa da soma térmica do ar foi calculada pela soma da temperatura média diária, correspondente a cada época de semeadura. Os dados meteorológicos consultados também permitiram definir o número de dias com temperatura mínima de 1°C a 7°C para estimativa de dias efetivos de vernalização. Além da consulta aos dados de temperatura, o fotoperíodo das diferentes épocas de avaliação no local dos experimentos foi obtido pelo site <http://www.solartopo.com/duracao-do-dia.htm>, o qual disponibiliza o fotoperíodo de um determinado dia e local.

3.1.4 Caracteres avaliados

Para os dois anos de condução dos experimentos, os caracteres avaliados foram: número de dias da emergência ao florescimento (NDEF), resposta à semeadura no cedo (RSC), estatura de plantas, comprimento de panícula e peso de panícula.

O número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) de cada genótipo foi estimado pelo número de dias entre a data da emergência e a data do florescimento pleno. A data de emergência foi determinada quando mais de 50% dos genótipos dentro de cada experimento apresentavam coleótilos visíveis acima da superfície do solo. A emergência das plantas na época de semeadura do cedo ocorreu nos dias 14 e 13 de junho, e das plantas na época de semeadura do tarde, nos dias 28 e 29 de agosto, para os anos de 2013 e 2014, respectivamente. Já a data do florescimento pleno foi atribuída para cada parcela, quando mais de 50% das plantas apresentavam panícula exposta (55° estágio da escala de Zadoks (Zadoks, 2001)). A resposta à semeadura no cedo (RSC) foi estimada pela diferença do número de dias entre o NDEF da semeadura do tarde, e o NDEF da semeadura do cedo para cada repetição, e ano.

Os caracteres estatura de plantas, comprimento de panícula e peso da panícula, os quais são considerados importantes componentes do rendimento de grãos em aveia, foram avaliados a partir de uma amostra de cinco plantas para cada linhagem, dentro de cada repetição e época avaliada. A estatura de plantas foi avaliada no campo, após a maturação fisiológica das plantas, através de uma leitura métrica, compreendendo a região entre a coroa da planta próxima à superfície do solo e o topo da panícula.

O comprimento da panícula e o peso de panícula foram determinados por leitura métrica e balança digital, respectivamente, no Laboratório de Fisiologia

Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura, na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado no município de Porto Alegre, RS. As panículas avaliadas quanto ao comprimento e peso foram armazenadas em câmara fria para a preservação da viabilidade das sementes.

3.1.5 Métodos estatísticos

Os resultados observados para o caráter florescimento, expressos pelo número de dias da emergência ao florescimento (NDEF), como também, pela resposta à semeadura no cedo (RSC) de cada genótipo avaliado, foram submetidos à análise descritiva, a qual consistiu em verificar a distribuição de frequência dos dados. O número de classes fenotípicas foi determinado pela raiz quadrada do número total de observações. O intervalo entre classes foi determinado pela divisão entre a amplitude total observada para o caráter avaliado e o número estimado de classes fenotípicas (Morettin, 2010).

A distribuição de frequências realizada permitiu verificar se os dados de NDEF e RSC enquadravam-se no modelo de Gauss, de distribuição normal. Essa distribuição considera que cerca de 68% das observações de NDEF devem estar entre a média \pm um desvio padrão, cerca de 95% das observações, entre a média \pm dois desvios padrão, e quase todas as observações, entre a média \pm três desvios padrão (Morettin, 2010).

As linhagens recombinantes da população foram agrupadas em três categorias quanto à sensibilidade ao fotoperíodo e à vernalização. O principal critério de classificação das linhagens foi a diferença do NDEF observado nos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605. Assim, as linhagens foram classificadas em: (i) insensíveis (linhagens recombinantes com NDEF semelhante ao NDEF observado para o genitor UFRGS 8), (ii) intermediárias (linhagens recombinantes

com NDEF intermediário entre o NDEF dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605) e, (iii) sensíveis (linhagens recombinantes com NDEF semelhante ao NDEF observado para o genitor UFRGS 930605).

Após a análise da distribuição de frequências e verificação da normalidade dos dados, foi realizada a análise de variância do número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) para cada época de semeadura, como também para a resposta à semeadura no cedo (RSC). O modelo linear foi utilizado para todas as análises de variância realizadas neste estudo. As causas de variação da análise do NDEF e da RSC foram: (i) genótipo, (ii) ano, (iii) repetição dentro dos anos e, (iv) interação genótipo x ano.

Posteriormente, o teste de comparação de médias do NDEF em cada época de semeadura, e da RSC dos genótipos foi realizado pelo teste de *Tukey*, a 5% de probabilidade. Além das análises de variância, regressões também foram calculadas para o número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) e RSC, considerando as diferentes épocas de semeadura e anos avaliados.

A associação do caráter florescimento, expresso pela variável NDEF e RSC, com os demais caracteres avaliados neste estudo (estatura de plantas, comprimento da panícula e peso de panícula) foi estimada pela análise de correlação de *Pearson*. Coeficientes de regressão e correlação (r) foram testados a 1% de significância. A plataforma *SAS Enterprise Guide 6.1* foi empregada para a realização das análises de variância, de comparação de médias e de correlação acima citadas. A análise de regressão, assim como, a obtenção dos gráficos descritivos dos dados foi realizada pelo programa *Sigma Plot 10* e pelo programa *Microsoft Excel 7*.

3.2 Análise molecular do florescimento em aveia

Para o desenvolvimento dos estudos moleculares, os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 foram empregados. Esta etapa do trabalho visou a clonagem e sequenciamento do gene *Vrn1* em aveia e a identificação de marcadores moleculares do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) específicos para o gene *Vrn1*. A caracterização molecular foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, localizado em Porto Alegre, RS.

3.2.1 Isolamento e purificação do DNA

Aproximadamente 20 sementes de cada genótipo foram germinadas em papel germinador, em uma BOD ajustada para uma temperatura constante de 24°C e um fotoperíodo de oito horas. Após seis dias, quando as plântulas apresentavam cerca de cinco centímetros, 0,1 a 0,2 g de tecidos do coleótilo, de no mínimo oito plântulas de cada genótipo foi coletado e macerado. A maceração foi realizada com nitrogênio líquido, e os tecidos macerados foram armazenados em um ultrafreezer a uma temperatura de -88°C.

O DNA dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605, e das linhagens recombinantes foi isolado e purificado conforme o protocolo adaptado de Lodhi *et al.* (1994) e de Lefort & Douglas (1999) descrito a seguir. O tampão de extração de DNA, autoclavado a 120°C por 20 minutos, foi composto de: 1% de CTAB, 2% de PVP40 (polivinilpirrolidona), 0,5% de Tween 20, 50 mM de Tris-HCl em pH 8,0, 20 mM de EDTA, 1,1 M NaCl e 0,4 M de LiCl. Logo antes da utilização do tampão, foi adicionado 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de β -mercaptoetanol. Em cada amostra de tecido macerada, foram adicionados 600 μL da solução tampão e aproximadamente 2 g de PVPP (polivinilpolipirrolidona). As amostras foram misturadas em vórtex, e incubadas a

60°C por 25 minutos. Após a incubação e resfriamento das amostras até a temperatura ambiente, foi adicionado 600 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1). As amostras foram continuamente invertidas por quatro minutos, para formar uma emulsão.

A emulsão formada foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. Aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Ao sobrenadante, foi adicionado 250 µL de NaCl (5 M) e após, a solução foi misturada em vórtex. Posteriormente, foi adicionado 750 µL de isopropanol gelado (-20°C) à solução, a qual novamente foi misturada em vórtex. Após, a solução foi refrigerada a 4°C por 15 a 20 minutos. Posteriormente ao resfriamento, a solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol (75%).

O *pellet* lavado foi seco em estufa a 37°C por 20 minutos, e após, ressuspenso em 100 µL de TE 1x em pH 8,0 + RNase (20 µg mL⁻¹), formando a solução com o DNA extraído. A solução foi incubada a 50°C por 15 minutos. A qualidade e a concentração do DNA purificado foram observadas em gel de agarose 1% e em espectrofotômetro. Após esta etapa, uma alíquota da solução estoque de DNA de cada genótipo foi diluída e ajustada para solução de trabalho, na concentração final de 15 ng µL⁻¹.

3.2.2 Amplificação do gene *Vrn1* em aveia

Para a amplificação do gene de vernalização *Vrn1* em aveia, reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas. Diferentes combinações de oligonucleotídeos iniciadores, aqui descritos como *primers* foram testados, incluindo: Ver-1.1, Ver-1.18 e Ver-1.19. Estas combinações de pares de *primers*

foram desenvolvidas a partir de alinhamentos heterólogos de sequências do gene *Vrn1* de trigo, cevada e avevém, conforme descrito por Nava *et al.* (2012). Além das combinações acima, o marcador SSR (*Simple Sequence Repeat*) AM87, desenvolvido por Pal *et al.* (2002), também foi utilizado. O marcador AM87 é considerado um marcador fortemente ligado ao gene *Vrn1* em aveia, obtido pelo mapeamento comparativo realizado por Nava *et al.* (2012). A sequência, orientação e número de nucleotídeos de cada par de *primer* utilizado estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Sequência, orientação e número de bases dos pares de *primers* utilizados na amplificação do gene *Vrn1* de aveia, como também do par de *primers* candidato AM87.

<i>Primer</i>	Orientação 5' - 3' <i>Foward (Direta)</i>	Base	Orientação 3' - 5' <i>Reverse (Reversa)</i>	Base
Ver-1.1	AAGCGGATCGAGAACAAGAT	20	TAGAGCTTCCCTTGGTGGA	20
Ver-1.18	ACTGAAGGCGAAGGTTGAGA	20	TGGATTTCGTGCATAAGTTGG	20
Ver-1.19	ACTGAAGGCGAAGGTTGAGA	20	TTCTCCTCCTGCAGTGACCT	20
AM87	GAGCAAGCTCTGGATGGAAA	20	CCCGTTTATGTGGTTGTTAGC	21

As combinações de *primers* foram testadas nos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605. As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, Hamburg, Germany). O volume de cada reação foi de 15 µL com 2,5mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 1 unidade da enzima *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 1x PCR *buffer* (disponível no mesmo kit da enzima *Taq DNA polimerase*), 200 µM de cada unidade do *primer* (“*forward*” e “*reverse*”) e 30 ng de DNA.

As condições de amplificação para cada reação foram: desnaturação inicial por três minutos a 94°C; seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos na temperatura específica de pareamento para cada combinação de pares de *primers* (59°C para Ver-1.1 e Ver-1.19; 63°C para Ver-1.18; 55°C para AM87) e dois minutos a 72°C (extensão). Uma reação final de

extensão foi conduzida por 10 minutos a 72°C. As reações foram armazenadas a 4°C ou a -20°C até a etapa de eletroforese em gel de agarose a 2%. Durante a eletroforese as amostras permaneceram emergidas em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5x por duas horas a 100 volts.

3.2.3 Clonagem e sequenciamento

Produtos de amplificação dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 de tamanho esperado para as combinações de pares de *primers* testadas foram excisados do gel de agarose e purificados pelo kit de extração de DNA *PureLink® Quick Extration* (Invitrogen). Após a purificação, a qualidade e a concentração do DNA foram observadas em gel de agarose 2% e em espectrofotômetro. O DNA purificado foi reamplificado com a mesma combinação de pares de *primers*, a fim de observar se a amplificação ocorreu na região de interesse do gene *Vrn1*. As reações de reamplificação seguiram as mesmas condições de amplificação descritas no item 3.2.2.

Os produtos de amplificação gerados a partir das combinações de pares de *primers* testadas foram clonados. Células competentes da bactéria *Escherichia coli* (XL1-Blue) utilizadas para a clonagem foram provenientes da multiplicação de uma suspensão bacteriana pré-existente. Uma colônia, proveniente do plaqueamento de uma suspensão bacteriana, foi incubada a 37°C por 16 horas sob agitação de 250 rpm, em 3 mL de meio LB líquido (10 g L⁻¹ de peptona + 5 g L⁻¹ de extrato de levedura + 5 g L⁻¹ de NaCl), contendo o antibiótico tetraciclina (10 mg mL⁻¹), o qual a bactéria *Escherichia coli* (XL1-Blue) é resistente.

O volume de 2 mL do inóculo de células preparado na etapa anterior foi transferido para 100 mL de um novo meio de cultura LB líquido (contendo tetraciclina), e incubado a 37°C por três horas sob agitação de 250 rpm. A

absorbância $_{600\text{ nm}}$ do meio LB líquido com as bactérias foi mensurada, e quando atingiram valores entre 0,3 e 0,4 (correspondendo a aproximadamente 10^8 células mL^{-1}), o crescimento bacteriano foi interrompido. O meio LB líquido com as células competentes foi disposto em gelo por 20 minutos. Posteriormente, o volume da solução de 100 mL foi dividido em dois tubos de 50 mL (*Falcon*). Os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 5.600 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, contendo as células bacterianas, foi ressuscitado em 50 mL de glicerol (10%) gelado para cada tubo *Falcon*.

As etapas de centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* foram realizadas por mais três vezes. Entretanto, o volume de glicerol (10%) gelado adicionado na etapa de ressuspensão foi reduzido para metade na segunda vez; para 2 mL na terceira vez (após esse momento, o volume da solução foi disposto em apenas um tubo *Falcon*), e para 0,4 mL na quarta vez. Alíquotas de 40 μL da nova suspensão bacteriana foram distribuídas em tubos de 0,5 mL, e rapidamente armazenadas no ultrafreezer a -88°C. Essa etapa do trabalho foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Agronomia da UFRGS, onde a suspensão bacteriana estava armazenada.

Após o preparo das células competentes, o protocolo utilizado nas próximas etapas de clonagem foi adaptado de Nava *et al.* (2012). As reações de clonagem ou de ligação foram realizadas em um volume final de 6 μL , contendo 1 μL do produto de reamplificação, 1 μL do vetor PCR™2.1-TOPO® (Invitrogen) contendo a enzima ligase, 0,25 μL da solução salina (1,2 M de NaCl e 0,06 M de MgCl_2) e 3,75 μL de água ultrapura Milli-Q®. A reação foi misturada gentilmente, mantida a temperatura ambiente por 12 minutos e armazenada em geladeira a 4°C.

A transformação das células competentes da bactéria *Escherichia coli* (XL1-Blue) foi realizada pelo método de eletroporação. A solução de transformação, contendo 40 µL de células competentes (descongeladas em gelo), adicionado de 2 µL da reação de clonagem, foi incubada por um minuto em gelo, e logo após, transferida para a cubeta de eletroporação. Posterior à eletroporação, foi adicionado à cubeta 1 mL do meio LB líquido (sem o antibiótico tetraciclina) em temperatura ambiente, para a transferência das células transformadas em um tubo *ependorff* de 2 mL.

As células transformadas foram mantidas sob agitação de 200 rpm, à 37°C, por uma hora e 20 minutos para promover a multiplicação das células. Nesta etapa, os tubos permaneceram na posição horizontal. Durante este período de agitação, 40 µL de X-gal (40 mg mL⁻¹) diluído em dimetil-formaldeído e 40 µL de IPTG (100 mM) foram distribuídos na superfície de placas de Petri, contendo meio LB sólido e os antibióticos tetraciclina (10 mg mL⁻¹) e canamicina (50 mg mL⁻¹).

O antibiótico tetraciclina seleciona a bactéria *Escherichia coli* (XL1-Blue), enquanto que a canamicina seleciona células bacterianas que contém o vetor PCR™2.1-TOPO®. A solução X-gal é responsável pela coloração azul de colônias que contém apenas o vetor, sem a inserção do fragmento de DNA desejado, enquanto que o IPTG é necessário para a indução da coloração das colônias. Além da adição destas substâncias, as placas foram pré-aquecidas a 37°C por 30 minutos, a fim de fornecer uma condição ideal para o crescimento das bactérias.

Após o período de agitação, um volume de 200 µL de células transformadas foi distribuído em cada placa de Petri (preparada conforme descrito acima). Desta forma, cinco placas de Petri para cada reação de transformação foram empregadas. Após o plaqueamento das células transformadas, as placas de Petri foram incubadas a 37° por 12 a 14 horas (*overnight*).

Após a multiplicação das células, 14 colônias individuais de coloração branca para cada reação de transformação foram inoculadas em 5 mL do meio de cultura LB líquido, contendo os antibióticos tetraciclina e canamicina nas mesmas concentrações apresentadas anteriormente. As colônias brancas representavam células bacterianas efetivamente transformadas e, portanto, apresentavam o fragmento de DNA de interesse inserido no vetor. Cada colônia foi incubada a 37°C sob agitação de 100 rpm por um período de 14 horas (*overnight*), promovendo a multiplicação das células bacterianas de cada colônia. Um controle negativo do meio de cultura, livre de inoculação, foi empregado com o propósito de garantir que o meio de cultura não apresentava contaminação por outros organismos.

Após o período de incubação, os tubos (*Falcon*) contendo meio de cultura e células multiplicadas foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado (o qual continha as células transformadas) foi ressuspensionado em 500 µL de MgSO₄ (100 mM). A solução ressuspensionada foi aquecida a 99°C em termociclador, por 10 minutos, promovendo a separação do plasmídeo (vetor + fragmento amplificado) da bactéria. Posterior ao aquecimento, a solução foi centrifugada a 12.500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado (o qual continha os plasmídeos), e armazenado em geladeira a 4°C; e o *pellet*, descartado (o qual era composto por debris celulares da bactéria).

A etapa de amplificação dos plasmídeos foi conduzida em duas reações principais. Na primeira reação, 5 µL do sobrenadante coletado foram adicionados ao coquetel, contendo 59 µL de água ultrapura Milli-Q®, 10 µL de Taq *Buffer* 10x e 6 µL de MgCl₂ (25 mM). A reação foi incubada por 30 minutos a 94°C em termociclador. Na segunda reação, 20 µL da primeira reação foram adicionados ao

coquetel, contendo 11 μL de água ultrapura Milli-Q[®], 8 μL de dNTPs (2,5 mM), 0,25 μL do *primer* universal M13 *Foward* (25 ng μL^{-1}), 0,25 μL do *primer* universal M13 *Reverse* (25 ng μL^{-1}) e 0,5 μL da enzima Taq Polimerase. As condições de amplificação foram: 30 ciclos de 2,5 minutos a 50°C, 3 minutos a 72°C e 1,5 minutos a 94°C. Uma reação final de extensão foi conduzida por 10 minutos a 72°C e mantida por 4°C.

O produto de amplificação dos insertos foi visualizado em gel de agarose a 2%, a fim de avaliar a qualidade e tamanho dos fragmentos de DNA clonados. Apenas fragmentos com tamanho esperado de amplificação para cada combinação de par de *primers* foram selecionados para o sequenciamento. A reação de sequenciamento para cada fragmento selecionado continha 1 μL da reação de amplificação dos insertos, 0,25 μL do primer M13 *Foward* (25 ng μL^{-1}) e 4,75 de água ultrapura Milli-Q[®]. O sequenciamento complementar, com o *primer* M13 *Reverse* também foi realizado. As amostras foram enviadas para o laboratório Ludwig Biotec, localizado no município de Alvorada, RS, onde o sequenciamento foi realizado.

3.3.4 Análise dos fragmentos clonados

Sequências específicas do gene *Vrn1* dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605, derivadas da clonagem e sequenciamento, foram exportadas dos cromatogramas e armazenadas no formato FASTA. Sequências do vetor, presentes nas sequências dos genitores, foram removidas manualmente.

As sequências clonadas e sequenciadas no presente estudo foram alinhadas e comparadas com sequências provenientes do gene *Vrn1* disponíveis no *GenBank* de *Triticum aestivum* L. (acesso AY747600) e do genótipo de aveia UFRGS 881971 (acesso HQ9110523 - amplificado pela combinação do par de

primers Ver-1.18 - e acesso HQ910519 - amplificado pela combinação do par de *primers* Ver-1.19; ambas sequências obtidas por Nava *et al.* (2012). O alinhamento de sequências foi realizado pelo programa *Mega 6.0*, disponível em <http://www.megasoftware.net/>.

A partir destes alinhamentos foi possível determinar o nível de identidade molecular entre as sequências analisadas e o nível de polimorfismo entre as mesmas. O nível de polimorfismo foi estimado pela frequência de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) presentes nas sequências dos diferentes genitores de aveia, para a mesma combinação de *primers*. As sequências de nucleotídeos de aveia também foram comparadas com outras sequências disponíveis em bancos de dados moleculares, utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Linear Alignment Sequence Tool*), disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Regiões exônicas das sequências de nucleotídeos de aveia que apresentaram SNP foram traduzidas em sequências de aminoácidos pelo programa *Mega 6.0*. As sequências de aminoácidos de aveia foram comparadas com a sequência de aminoácidos de *Triticum aestivum* L. (acesso AAW73221.1), disponível no *GenBank* para verificar a semelhança na sequência de aminoácidos.

4 RESULTADOS

4.1 Análise fenotípica do florescimento em aveia

A análise fenotípica do florescimento em aveia consistiu na avaliação da variação do número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) e da resposta à semeadura no cedo (RSC) observada entre as linhagens recombinantes da população em estudo. Além disso, a análise fenotípica do florescimento consistiu em relacionar a variação do florescimento observada das linhagens recombinantes com a variação dos sinais de fotoperíodo e temperatura observada durante a condução dos experimentos.

A soma térmica no ano de 2013 foi menor que no ano de 2014 na época de semeadura do cedo. Portanto, o ano de 2013 apresentou temperaturas médias inferiores em relação ao ano de 2014. Na época de semeadura do tarde, a diferença da soma térmica entre os anos foi menor, porém ao contrário da época de semeadura do cedo, o ano de 2013 registrou temperaturas médias mais elevadas durante o período de crescimento das plantas em comparação ao ano de 2014 (Tabela 2). Apesar disso, o número efetivo de dias de vernalização foi superior no ano de 2013 tanto na época de semeadura do cedo quanto do tarde. Na época de semeadura do cedo, 19 e 16 dias de vernalização foram registrados nos anos de 2013 e 2014, respectivamente. Já na época de semeadura do tarde, 6 e 1 dias de vernalização foram registrados nos anos de 2013 e 2014, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2. Soma térmica e número de dias de vernalização ocorridos nas épocas de semeadura do cedo e do tarde, nos anos de 2013 e 2014.

Dados meteorológicos	Época de semeadura			
	Cedo		Tarde	
	2013	2014	2013	2014
Duração máxima de ciclo (dias)*	124	121	92	93
Soma térmica (°C)**	1857	1980	1701	1657
Número de dias de vernalização [§]	19	16	6	1

*Dias entre a data de semeadura e a data de florescimento da última linhagem recombinante mais tardia.
 **Soma térmica da média diária do período da duração máxima de ciclo. [§]Número de dias que apresentaram temperaturas entre 1°C a 7°C, consideradas efetivas para vernalização em aveia no período de duração máxima de ciclo.

A cidade de Eldorado do Sul apresenta fotoperíodo mínimo de 10 horas, e máximo de 14 horas, sendo a duração de 12 horas o fotoperíodo limite entre o fotoperíodo curto e longo. Durante a condução dos experimentos, a condição do fotoperíodo variou em: (i) fotoperíodo curto e decrescente nos primeiros 20 dias de cultivo na época de semeadura do cedo até o dia 24 de junho. Após esta data, o fotoperíodo foi de (ii) fotoperíodo curto, porém crescente, e manteve-se deste modo por 85 dias, até o dia 20 de setembro. Após esse dia, o fotoperíodo foi alterado para (iii) fotoperíodo longo e crescente até o término de avaliação do experimento. Na época de semeadura do tarde, nos primeiros 30 dias, o fotoperíodo foi curto e crescente, e posteriormente, longo e crescente. Na Tabela 3, estão resumidas as informações sobre as condições de fotoperíodo no local e épocas onde os experimentos de campo foram conduzidos.

TABELA 3. Condições de fotoperíodo ocorridas durante o crescimento das plantas na época de semeadura do cedo e do tarde, nos anos de 2013 e 2014.

Período do ano	Condições de fotoperíodo		Ocorrência nas épocas de semeadura	
	Horas	Taxa	Cedo	Tarde
04/06 a 24/06	<12 (curto)	decrescente	Sim	Não
24/06 a 20/09	<12 (curto)	crescente	Sim	Sim
20/09 a 31/12	>12 (longo)	crescente	Sim	Sim

A distribuição de frequências das linhagens recombinantes para o NDEF médio observado nas épocas de semeadura do cedo e do tarde no ano de 2013 está apresentada na Figura 3. Na semeadura do cedo, o NDEF médio das linhagens recombinantes variou de 88 a 113 dias, com amplitude total de variação de 25 dias. Das linhagens recombinantes avaliadas, 68% apresentaram valores de NDEF entre 90 e 97 dias. Na semeadura do tarde, o NDEF médio das linhagens recombinantes variou de 60 a 85 dias, com amplitude total de variação de 25 dias. Das linhagens recombinantes avaliadas, 67% apresentaram valores de NDEF entre 60 e 67 dias. O desvio padrão dos dados em relação à média foi de 4,7 e 4,3 dias; e o coeficiente de variação foi de 5% e 6,6% nas épocas de semeadura do cedo e do tarde, respectivamente.

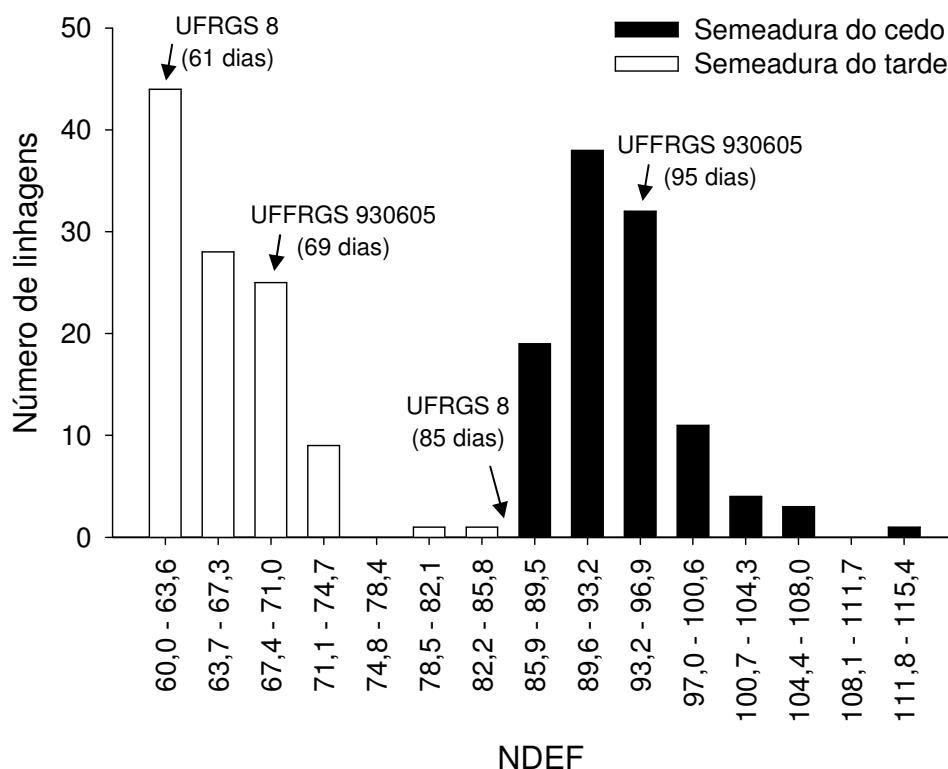


FIGURA 3. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia, avaliadas nas épocas de semeadura do cedo e do tarde no ano de 2013, para o número de dias da emergência ao florescimento (NDEF). O NDEF observado para os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 nas duas épocas de semeadura é indicado na figura pelas setas.

O NDEF médio do genitor UFRGS 8 foi de 85 dias e do genitor UFRGS 930605 foi de 95 dias na época de semeadura do cedo. Assim, uma diferença de 10 dias no florescimento foi observada entre os genitores. Na época de semeadura do tarde, o NDEF médio do genitor UFRGS 8 foi de 61 dias e do genitor UFRGS 930605 foi de 69 dias. Logo, os genitores diferiram em oito dias quanto ao florescimento nesta época de semeadura. O NDEF do genitor UFRGS 8 não se enquadrou em nenhuma classe de distribuição de frequências das linhagens recombinantes avaliadas na época de semeadura do cedo, demonstrando ser mais precoce em relação a todas as linhagens avaliadas nesta época de semeadura (Figura 3).

A distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia para o NDEF médio observado nas épocas de semeadura do cedo e do tarde no ano de 2014 está apresentada na Figura 4. Na semeadura do cedo, o NDEF médio das linhagens recombinantes variou de 82 a 114 dias, com amplitude total de variação de 32 dias. Das linhagens recombinantes avaliadas, 70% apresentaram valores de NDEF de 83 a 96 dias. Na semeadura do tarde, o NDEF médio das linhagens recombinantes variou de 54 a 81 dias, com amplitude total de variação de 27 dias. Das linhagens recombinantes avaliadas nessa época, 70% apresentaram valores de NDEF de 58 a 66 dias. O desvio padrão dos dados em relação à média foi de 6,5 e 4,6 dias; e o coeficiente de variação foi de 7,1% e 7,4% nas épocas de semeadura do cedo e do tarde, respectivamente.

O NDEF médio do genitor UFRGS 8 foi de 79 dias, e do genitor UFRGS 930605 foi de 98 dias na época de semeadura do cedo. A diferença entre o NDEF dos genitores, portanto, foi de 19 dias. Na época de semeadura do tarde, o genitor UFRGS 8 apresentou NDEF médio de 56 dias, enquanto que o genitor UFRGS 930605 apresentou NDEF médio de 63 dias. A diferença do florescimento entre os

genitores foi de sete dias nessa época de semeadura. Nesse ano, o NDEF médio do genitor UFRGS 8 na semeadura do cedo enquadrou-se na primeira classe de distribuição de frequência (Figura 4).

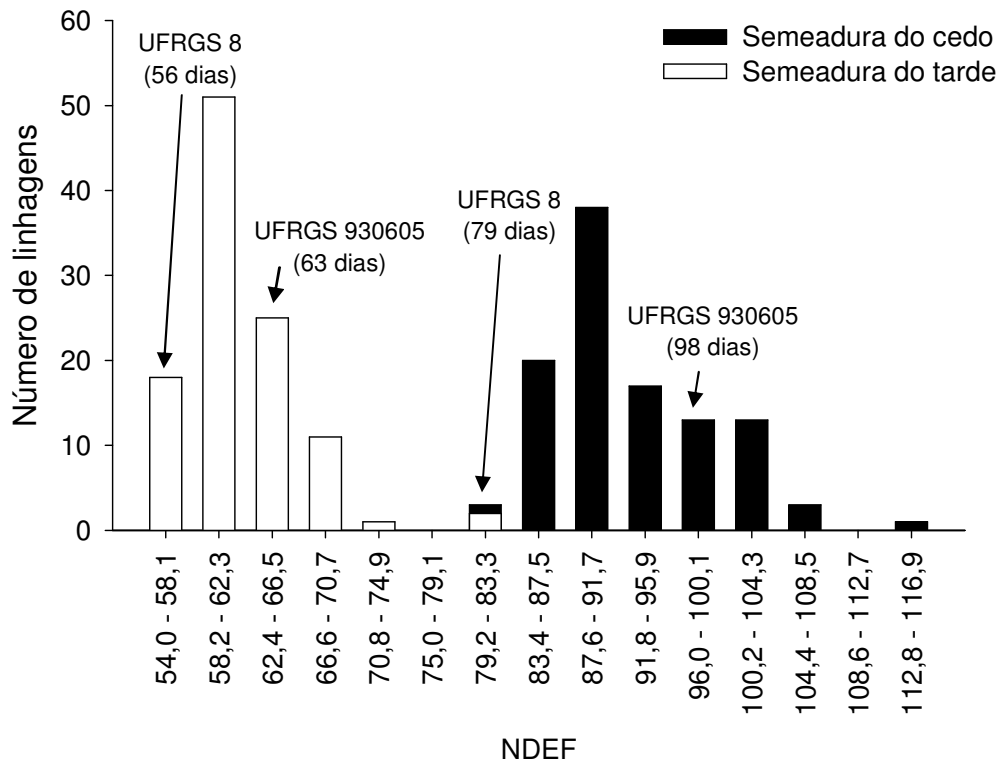


FIGURA 4. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia avaliadas nas épocas de semeadura do cedo e do tarde no ano de 2014, para o número de dias da emergência ao florescimento (NDEF). O NDEF observado para os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 nas duas épocas de semeadura é indicado na figura pelas setas.

Diagramas em *box-plot* do NDEF das linhagens recombinantes organizados por época de semeadura e por ano estão apresentados na Figura 5. Para cada época de semeadura e ano, houve um total de 216 observações do NDEF (108 linhagens x 2 repetições). Na semeadura do cedo, a média do NDEF da população de linhagens recombinantes foi de 94 e 92 dias, enquanto que na semeadura do tarde foi de 66 e 62 dias, nos anos de 2013 e 2014, respectivamente. A aproximação dos valores da média e da mediana do NDEF em cada experimento configura uma distribuição normal dos dados.

Pela largura das caixas dos diagramas, foi observado que na semeadura do cedo, a distribuição dos valores de NDEF foi maior no ano de 2014, quando comparado ao ano de 2013. Na semeadura do tarde, no entanto, não foi observada diferença entre anos na distribuição do NDEF (Figura 5).

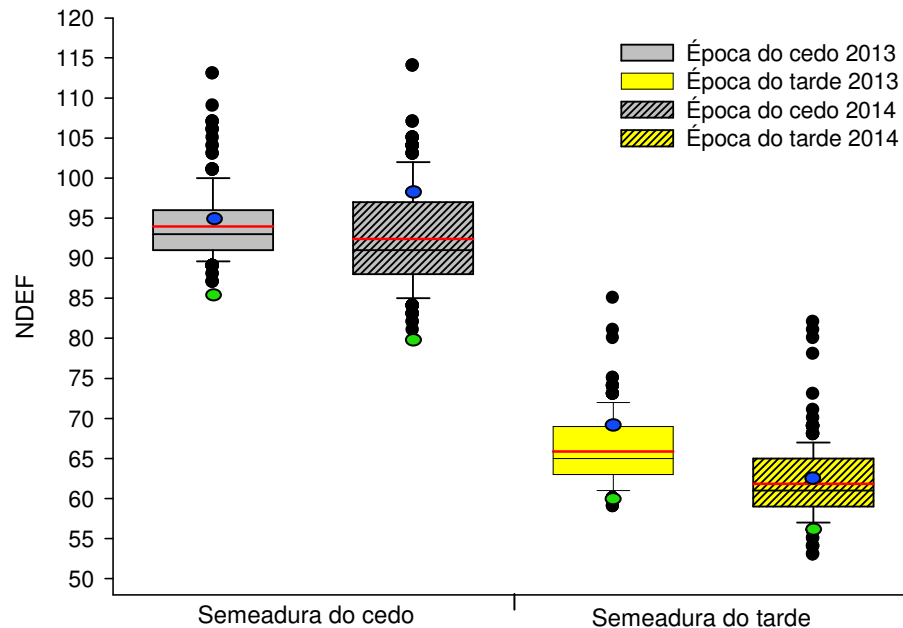


FIGURA 5. Diagrama do número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) em linhagens recombinantes de aveia. A época de semeadura do cedo é representada por caixas cinzas, enquanto que a época de semeadura do tarde é representada por caixas amarelas. Caixa cinza e amarela sem ranhuras representam o ano de 2013, e com ranhuras o ano de 2014. No interior das caixas, as linhas pretas representam medianas, enquanto que as linhas vermelhas representam médias. Os pontos pretos representam observações acima e abaixo dos percentis 0,9 e 0,1, respectivamente. Os pontos verdes representam o genitor UFRGS 8, enquanto que os pontos azuis representam o genitor UFRGS 930605.

Pela altura da posição das caixas no gráfico, também é observado que o NDEF na semeadura do tarde foi antecipado no ano de 2014, quando comparado ao ano de 2013. Na semeadura do cedo, a posição das caixas dos dois anos foi similar. O ano de 2013 apresentou menor variação de distribuição do NDEF entre épocas de semeadura quando comparado ao ano de 2014. Pela mediana, é observado que os primeiros 54 valores de NDEF das linhagens recombinantes

apresentaram menor variação do que os últimos 54 valores de NDEF em todos os experimentos (Figura 5).

A relação entre o NDEF das linhagens recombinantes e dos genitores avaliados está demonstrada na Figura 6. O coeficiente de determinação entre o NDEF observado no ano de 2013 com o NDEF observado no ano de 2014 foi de 0,69 e 0,65 para as épocas de semeadura do cedo e do tarde, respectivamente (Figura 6A e 6B). Já o coeficiente de determinação entre o NDEF observado na época de semeadura do cedo, com o NDEF observado na época de semeadura do tarde foi de 0,63 e 0,60 para os anos de 2013 e 2014, respectivamente (Figura 6C e 6D). O coeficiente de determinação médio dos anos avaliados entre o NDEF observado na época de semeadura do cedo com o NDEF observado na época de semeadura do tarde foi de 0,59 (Figura 6E).

Esses resultados demonstraram que as linhagens recombinantes e os genitores apresentaram duração de ciclo vegetativo similar em uma mesma época de semeadura nos dois anos de avaliação (Figura 6A e 6B). Ainda, na Figura 6A, é observado que nenhum NDEF das linhagens recombinantes da população aproximou-se do NDEF do genitor UFRGS 8 na época de semeadura do cedo. Por outro lado, na época de semeadura do tarde, o NDEF de linhagens recombinantes próximo ao NDEF do genitor UFRGS 8 foi observado (Figura 6B). No entanto, para as duas épocas de semeadura, o NDEF das linhagens recombinantes variou entre o NDEF dos genitores até valores acima do NDEF do genitor UFRGS 930605 (Figura 6A e 6B).

A relação entre o NDEF das diferentes épocas de semeadura demonstrou que a relação de duração do ciclo vegetativo entre as linhagens recombinantes não foi alterada de maneira significativa, tanto para o ano de 2013 (Figura 6C), quanto para o ano de 2014 (Figura 6D), como na média dos anos avaliados

(Figura 6E). Em todos os gráficos da Figura 6, é observado que a porção do NDEF das linhagens recombinantes intermediária ao NDEF dos genitores apresentou menor dispersão do que os valores do NDEF das linhagens recombinantes acima do genitor UFRGS 930605.

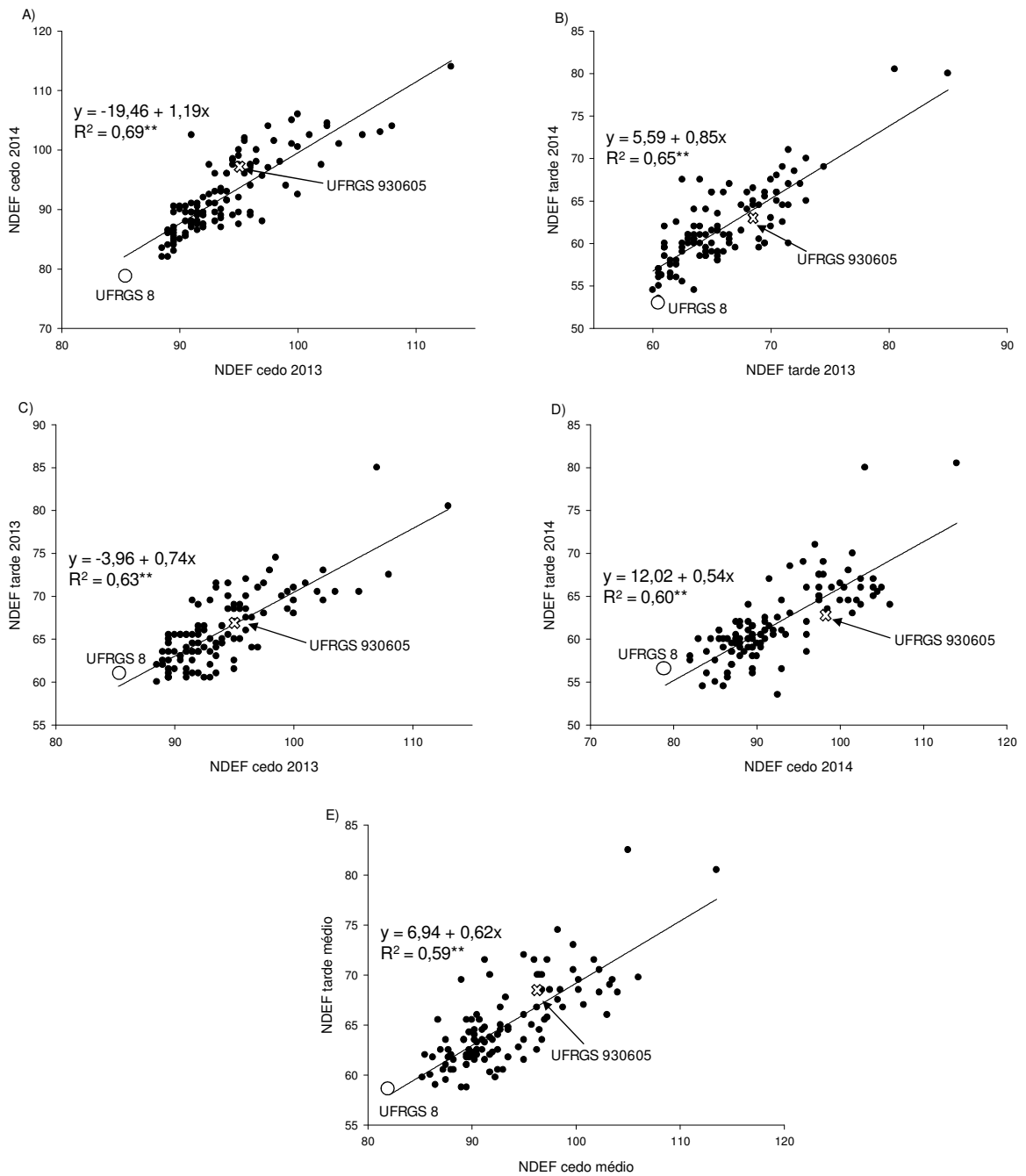


FIGURA 6. Regressão do NDEF das linhagens recombinantes (pontos pretos) e dos genitores UFRGS 8 (ponto maior de coloração branca) e UFRGS 930605 (xis branco) nos anos de 2013 e 2014.

A partir da diferença entre o NDEF da época de semeadura do tarde e da época de semeadura do cedo, foi estimada a variável resposta à semeadura no cedo (RSC) para cada linhagem recombinante avaliada. A RSC de todas as linhagens recombinantes, nos dois anos, foi negativa (Figura 7 e 8). O valor de RSC negativo demonstrou que o NDEF das linhagens recombinantes foi antecipado na época de semeadura do tarde em comparação à época de semeadura do cedo.

No ano de 2013, a RSC média das linhagens recombinantes variou de -22 dias a -35 dias, com amplitude total de variação de 13 dias. Entre as linhagens recombinantes avaliadas, 57% apresentaram valores de RSC de -30 a -26 dias. A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação foram de -28 dias, 2,85 dias e 10,2%, respectivamente. O genitor UFRGS 8 apresentou RSC de -24 dias, enquanto que o genitor UFRGS 930605 apresentou RSC de -26 dias. A diferença da RSC entre os genitores foi de apenas -2 dias (Figura 7).

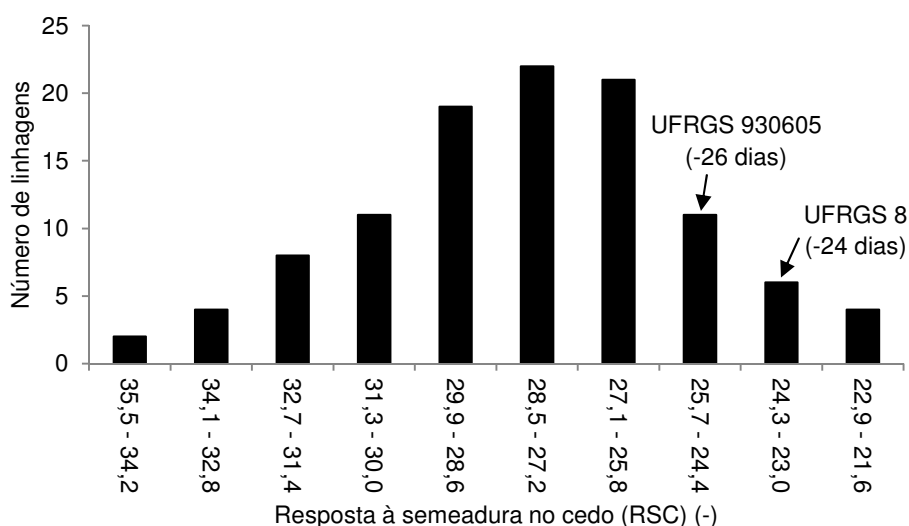


FIGURA 7. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre UFRGS 8 x UFRGS 930605 para a resposta à semeadura no cedo (RSC) no ano de 2013. As flechas apontam as classes da RSC dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605.

No ano de 2014, a RSC média das linhagens recombinantes variou de -23 dias a -42 dias, com amplitude total de variação de 19 dias. Entre as linhagens recombinantes avaliadas, 55% apresentaram RSC que variou de -30 a -26 dias. A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação foram de -31 dias, 4,10 dias e 13,3%, respectivamente. O genitor UFRGS 8 apresentou RSC de -23 dias, enquanto que o genitor UFRGS 930605 apresentou RSC de -35 dias (Figura 8). A diferença entre a RSC dos genitores foi de -12 dias, representando 10 dias a mais, quando comparado ao ano de 2013 (Figura 7). No ano de 2014, a RSC do genitor UFRGS 930605 foi 9 dias menor, enquanto que a RSC do genitor UFRGS 8 foi 1 dia maior, quando comparadas com os valores da RSC no ano de 2013 (Figura 7 e 8).

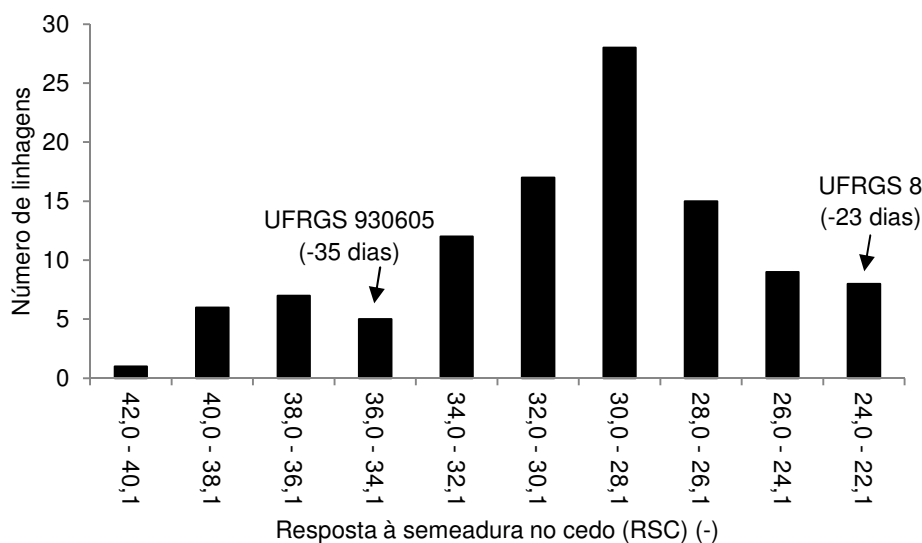


FIGURA 8. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre UFRGS 8 x UFRGS 930605 para a resposta à semeadura no cedo (RSC) no ano de 2014. As flechas apontam as classes da RSC dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605.

As associações entre a RSC com o NDEF, como também, entre os valores da RSC dos diferentes anos avaliados das linhagens recombinantes e dos genitores estão demonstradas na Figura 9.

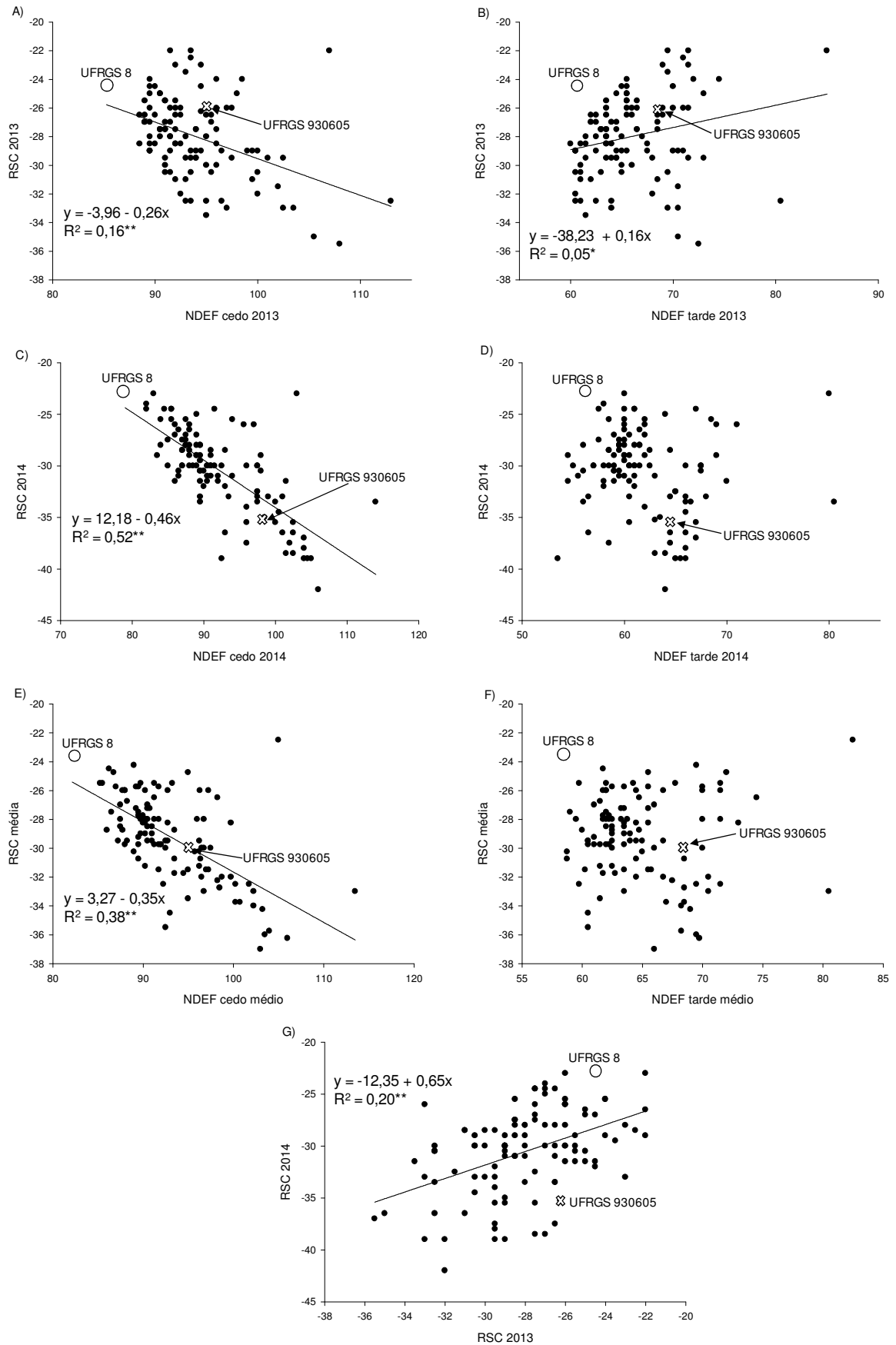


FIGURA 9. Relação entre o NDEF e a RSC das linhagens recombinantes (pontos pretos) e dos genitores UFRGS 8 (ponto maior de coloração branca) e UFRGS 930605 (xis branco).

Para a época de semeadura do cedo, a relação obtida entre a RSC e o NDEF apresentou valores de coeficiente de determinação de 0,16 (Figura 9A), 0,58 (Figura 9C) e 0,38 (Figura 9E) no ano de 2013, no ano de 2014 e na média dos anos, respectivamente. Já para época de semeadura do tarde, a relação obtida entre a RSC e o NDEF apresentou valor de coeficiente de determinação significativo apenas no ano de 2013 (Figura 9B). Esse valor de coeficiente de determinação foi baixo, de 0,05, e significativo apenas a 5% de probabilidade. Na Figura 9G é observada a relação obtida entre a RSC no ano de 2013 com a RSC no ano de 2014. O valor de coeficiente de determinação foi de 0,2. A RSC das linhagens recombinantes apresentou valores com distribuição mais dispersa entre anos, quando comparado ao NDEF.

Assim como para as relações obtidas entre NDEF de diferentes anos e épocas de semeadura (Figura 6), nenhuma linhagem recombinante apresentou relação entre NDEF e RSC similar ao genitor UFRGS 8. Em comparação ao genitor UFRGS 8, a RSC das linhagens recombinantes foi apenas menor, enquanto que em comparação ao genitor UFRGS 930605, a RSC das linhagens foi tanto maior quanto menor (Figura 9).

Na época de semeadura do cedo, a relação obtida entre o NDEF e a RSC das linhagens recombinantes foi linear e negativa. Quanto maior o NDEF observado, menor foi o valor da RSC associado (Figura 9A, 9C e 9E). No presente estudo, a RSC mais negativa representou maior diferença na duração do ciclo vegetativo entre as diferentes épocas avaliadas, o que configura uma maior resposta da planta às variações dos sinais ambientais externos entre épocas de semeadura. Linhagens tardias, portanto, foram associadas à característica de maior sensibilidade às variações ambientais.

Na época de semeadura do tarde, no entanto, a relação entre o NDEF e a RSC apresentou maior dispersão quando comparada com a relação obtida na época de semeadura do cedo (Figura 9B, 9D e 9F). Por esse motivo, não foi possível detectar associação entre os valores de RSC e NDEF nessa época de semeadura, exceto no ano de 2013, no qual a relação foi linear e positiva, mas de baixo valor e significância (Figura 9B).

Em todas as análises, foi determinada interação significativa entre genitor e ano de avaliação (Tabela 4). O genitor UFRGS 930605 apresentou o maior NDEF nas duas épocas de semeadura, e nos dois anos, em relação ao genitor UFRGS 8 (Tabela 5).

TABELA 4. Análise de variância do número de dias da emergência ao florescimento na época de semeadura do cedo (NDEF cedo), na época de semeadura do tarde (NDEF tarde) e da resposta à semeadura no cedo (RSC) dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605.

Causas da variância	GL	SQ	QM	F	P
NDEF cedo[†]					
Genitor	1	826,56	826,56	1.725,00	<0,0001
Ano	1	7,56	7,56	15,78	0,0073
Repetição (Ano)	6	5,38	0,90	1,87	0,23
Genitor x Ano	1	95,06	95,06	198,39	<0,0001
Erro experimental	6	2,88	0,48		
NDEF tarde[§]					
Genitor	1	210,25	210,25	1.682,00	<0,0001
Ano	1	100,00	100,00	800,00	<0,0001
Repetição (Ano)	6	3,75	0,63	5,00	0,036
Genitor x Ano	1	1,00	1,00	8,00	0,030
Erro experimental	6	0,75	0,13		
RSC*					
Genitor	1	203,06	203,06	314,42	<0,0001
Ano	1	52,56	52,56	81,39	0,0001
Repetição (Ano)	6	11,38	1,90	2,94	0,108
Genitor x Ano	1	115,56	115,56	178,94	<0,0001
Erro experimental	6	3,88	0,65		

[†]Número de dias da emergência ao florescimento na semeadura do cedo, para os anos de 2013 e 2014.

[§]Número de dias da emergência ao florescimento na semeadura do tarde, para os anos de 2013 e 2014. *Resposta a semeadura do cedo, estimada pela diferença entre o NDEF observado na época do tarde e o NDEF observado na época do cedo.

Na semeadura do cedo no ano de 2013, o NDEF do genitor UFRGS 8 foi maior, enquanto que o NDEF do genitor UFRGS 930605 foi menor, quando

comparado com o NDEF no ano de 2014. Na semeadura do tarde, o NDEF foi maior no ano de 2013, independente do genitor. Apenas no ano de 2014, houve diferença da RSC entre os genitores. A RSC do genitor UFRGS 930605 diferiu entre anos, sendo maior em 2013 e menor em 2014, enquanto que a RSC do genitor UFRGS 8 não diferiu entre anos (Tabela 5).

TABELA 5. Comparação de médias do número de dias da emergência ao florescimento na época de semeadura do cedo (NDEF cedo), na época de semeadura do tarde (NDEF tarde) e da resposta à semeadura no cedo (RSC) entre os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 avaliados nos anos de 2013 e 2014.

Genitores	NDEF cedo		NDEF tarde		RSC	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014
UFRGS 8	85,25 C	79 D	60,75 c	56,25 d	-24,5 ab	-22,75 b
UFRGS 930605	94,75 B	98,25 A	68,5 a	63 b	-26,25 a	-35,25 c

Comparação de médias realizada pelo teste Tukey (5% de probabilidade). Cada tipo de letra (maiúscula, minúscula, ou itálica) pode ser comparada tanto entre linhas quanto entre colunas de um mesmo grupo de comparação de médias (NDEF cedo, NDEF tarde e RSC).

Os dados meteorológicos demonstraram que no ano de 2013, temperaturas mais baixas foram registradas em comparação ao ano de 2014, durante o período de condução dos experimentos na época de semeadura do cedo (Tabela 2). Esta diferença na temperatura entre os anos influenciou de maneira oposta no NDEF dos genitores nessa época de semeadura. Na época de semeadura do cedo, no ano de 2013 comparado ao ano de 2014, o NDEF do genitor UFRGS 8 foi maior, enquanto que o NDEF do genitor UFRGS 930605 foi menor (Tabela 5).

A partir do NDEF contrastante dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 na época de semeadura do cedo, foi realizada uma classificação das linhagens recombinantes quanto à sensibilidade ao fotoperíodo e à vernalização. As linhagens recombinantes foram classificadas em: (i) insensíveis ao fotoperíodo e à vernalização, quando o NDEF das linhagens foi maior em 2013, em relação ao ano de 2014 (NDEF semelhante ao genitor UFRGS 8, o qual é insensível ao

fotoperíodo e à vernalização); (ii) sensíveis ao fotoperíodo e à vernalização, quando o NDEF das linhagens foi menor em 2013, em relação a 2014 (NDEF semelhante ao genitor UFRGS 930605, o qual apresenta resposta de sensibilidade ao fotoperíodo e à vernalização); e (iii) intermediárias, quando o NDEF das linhagens variou de -1 a 1 dia entre os anos avaliados.

Para a classificação das linhagens recombinantes descrita acima, apenas o NDEF observado nos experimentos na época de semeadura do cedo, nos anos de 2013 e 2014 foi considerado. Nessa época, o genitor UFRGS 8 apresentou diminuição, enquanto que o genitor UFRGS 930605 apresentou aumento do NDEF no ano de 2014 em comparação ao ano de 2013. Na época de semeadura do tarde, diferente do que ocorreu na época de semeadura do cedo, ambos genitores (UFRGS 8 e UFRGS 930605) apresentaram diminuição do NDEF no ano de 2014 em comparação com o ano de 2013.

Portanto, o NDEF observado na semeadura do tarde nos anos de 2013 e 2014 não foi considerado para a classificação das linhagens recombinantes, devido à impossibilidade de detecção de diferentes variações do NDEF dos genitores entre os anos avaliados. No entanto, essa classificação também é válida para a época de semeadura do tarde, devido à existência de uma associação significativa entre o NDEF nas épocas de semeadura do cedo e do tarde (Figura 6).

A porcentagem de linhagens recombinantes classificadas como insensíveis, intermediárias e sensíveis ao fotoperíodo e à vernalização foi de 59%, 18% e 23%, respectivamente (Tabela 6). A partir da classificação das linhagens recombinantes, os efeitos da variação genotípica e anual sobre o NDEF da semeadura do cedo, da semeadura do tarde e sobre a RSC foram avaliados pela análise de variância (Tabela 7).

TABELA 6. Classificação das linhagens recombinantes de aveia quanto à sensibilidade ao fotoperíodo e à vernalização.

Classificação	Linhagens recombinantes	Porcentagem (%)
Insensíveis	64	59
Intermediárias	19	18
Sensíveis	25	23
Total	108	100

Interação significativa entre linhagem e ano de avaliação foi determinada para o NDEF da época de semeadura do cedo e para a RSC. Para o NDEF da época de semeadura do tarde, os fatores principais linhagem recombinante e ano de avaliação foram significativos (Tabela 7).

TABELA 7. Análise de variância do número de dias da emergência ao florescimento na época de semeadura do cedo (NDEF cedo), na época de semeadura do tarde (NDEF tarde) e da resposta à semeadura no cedo (RSC) das linhagens recombinantes avaliadas nos anos de 2013 e 2014.

Causas da variância	GL	SQ	QM	F	p
NDEF cedo[†]					
Linhagem recombinante [‡]	2	3.459,09	1.729,55	77,65	<0,0001
Ano	1	2,90	2,90	0,13	0,7184
Repetição (Ano)	2	14,39	7,20	0,32	0,7240
Linhagem x Ano	2	1.063,67	531,84	23,88	<0,0001
Erro experimental	423	9.421,80	22,27		
NDEF tarde[§]					
Linhagem recombinante	2	798,32	399,16	22,13	<0,0001
Ano	1	1.101,26	1.101,26	61,06	<0,0001
Repetição (Ano)	2	89,80	44,89	2,49	0,0842
Linhagem x Ano	2	55,74	27,87	1,55	0,2145
Erro experimental	421	7.593,47	18,04		
RSC*					
Linhagem recombinante	2	989,60	494,80	40,09	<0,0001
Ano	1	1.029,13	1.029,13	83,39	<0,0001
Repetição (Ano)	2	88,65	44,32	3,59	0,0284
Linhagem x Ano	2	618,16	309,08	25,05	<0,0001
Erro experimental	421	5.195,55	12,34		

[‡]Linhagem recombinante classificada em insensível, intermediária e sensível ao fotoperíodo e à vernalização. [†]Número de dias da emergência ao florescimento na semeadura do cedo, para os anos de 2013 e 2014. [§]Número de dias da emergência ao florescimento na semeadura do tarde, para os anos de 2013 e 2014. *Resposta a semeadura do cedo, estimada pela diferença entre o NDEF observado na época do tarde e o NDEF observado na época do cedo.

Para os dois anos de avaliação, na época de semeadura do cedo, as linhagens sensíveis apresentaram maior NDEF que linhagens insensíveis (Tabela

8). Ainda, foi observado que a diferença do NDEF entre linhagens sensíveis e insensíveis foi maior no ano de 2014, resultado também observado entre os genitores. As linhagens intermediárias apenas diferiram das outras classificações de linhagens no ano de 2014, e não no ano de 2013 (Tabela 8).

TABELA 8. Comparação de médias do número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) na semeadura do cedo (NDEF cedo) e na semeadura do tarde (NDEF tarde), e da resposta à semeadura no cedo (RSC) entre as linhagens recombinantes de aveia avaliadas nos anos de 2013 e 2014.

Linhagens recombinantes	NDEF cedo		NDEF tarde [§]	RSC	
	2013	2014	Média	2013	2014
Insensíveis	93,10 C	89,1 D	62,86 b	-27,84 a	-28,47 a
Intermediárias	93,97 BC	93,94 BC	64,13 b	-28,05 a	-31,6 b
Sensíveis	96,24 B	99,72 A	66,19 a	-28,64 a	-35,02 c

Comparação de médias realizada pelo teste Tukey (5% de probabilidade). Cada tipo de letra (maiúscula, minúscula, ou itálica) pode ser comparada tanto entre linhas quanto entre colunas de um mesmo grupo de comparação de médias (NDEF cedo e RSC). [§]Apenas houve diferença significativa dos fatores principais "linhagem" e "ano".

Na época de semeadura do tarde, o NDEF das linhagens sensíveis foi maior quando comparado aos outros tipos de linhagens, e o NDEF das linhagens insensíveis e intermediárias não diferiu (Tabela 8). Ainda nessa época de semeadura, foi observado efeito de ano. No ano de 2013, o NDEF médio das linhagens foi maior, com 66,2 dias, que no ano de 2014, com 62,6 dias. A RSC, no ano de 2013, não variou entre os tipos de linhagens recombinantes. No entanto, em 2014, a RSC das três classificações foi distinta. A RSC das linhagens insensíveis, intermediárias e sensíveis foi maior, intermediária e menor, respectivamente. A RSC das linhagens insensíveis não variou entre anos, enquanto que a RSC das demais linhagens diminuiu no ano de 2014.

A correlação entre as variáveis NDEF, RSC, estatura de plantas, peso de panícula e comprimento de panícula para as épocas de semeadura do cedo e do tarde foi avaliada (Tabela 9). O NDEF da semeadura do cedo foi correlacionado

negativamente com a RSC e positivamente com a estatura de plantas e comprimento de panícula. A RSC, quando relacionada com todas as outras variáveis na época de semeadura do cedo, apresentou correlação negativa, exceto para o peso de panícula, com a qual não houve correlação significativa. O NDEF na semeadura do tarde foi correlacionado apenas com a RSC (positivamente) e com a estatura de plantas (negativamente). A RSC na semeadura do tarde, além de correlacionar-se com o NDEF, foi correlacionada negativamente com a estatura de plantas.

TABELA 9. Coeficientes de correlação de *Pearson* entre o valor médio dos anos de 2013 e 2014 das variáveis NDEF, RSC, estatura de plantas, peso de panícula e comprimento de panícula da época de semeadura do cedo e da época de semeadura do tarde.

Variáveis	NDEF	RSC	EST	PP	CP
Época de semedura do cedo					
NDEF [†]	-	-0,551**	0,277**	-0,03 ^{ns}	0,458**
RSC [§]		-	-0,311**	-0,071 ^{ns}	-0,244**
Estatura (EST)			-	0,279**	0,515**
Peso de panícula (PP)				-	0,384**
Comprimento de panícula (CP)					-
Época de semedura do tarde					
NDEF [†]	-	0,211**	-0,288**	-0,078 ^{ns}	0,071 ^{ns}
RSC [§]		-	-0,345**	-0,087 ^{ns}	-0,200**
Estatura (EST)			-	0,376**	0,433**
Peso de panícula (PP)				-	0,312**
Comprimento de panícula (CP)					-

[†]Número de dias da emergência ao florescimento, [§]Resposta à semeadura no cedo, **significativo à 1%; ^{ns}não significativo.

As linhagens recombinantes apresentaram variação do NDEF e da RSC quando avaliadas em condições ambientais similares. Por esse motivo, é esperado que a principal causa da variação observada entre o florescimento das linhagens recombinantes neste estudo sejam fatores genéticos, e não ambientais.

4.2 Análise molecular do florescimento em aveia

Para ambos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605, o tamanho aproximado do fragmento amplificado pelas combinações dos pares de *primers* Ver-1.1, Ver-1.18 e Ver-1.19 foram de 140, 422 e 618 bases, respectivamente (Figura 10). O tamanho dos fragmentos observados corresponde ao tamanho de fragmentos esperados de amplificação para cada combinação de par de *primers*.

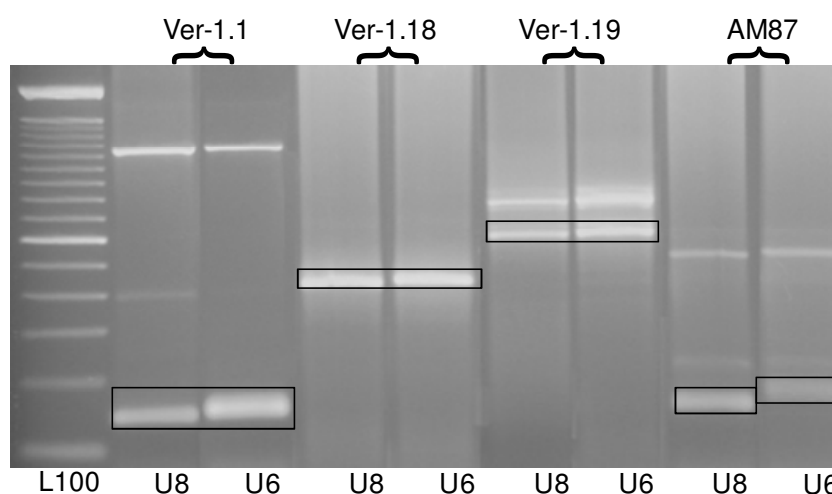


FIGURA 10. Gel de agarose do DNA amplificado pelos pares de *primers* Ver-1.1, Ver-1.18, Ver-1.19 e AM87 dos genitores UFRGS 8 (U8) e UFRGS 930605 (U6). L100 (Ladder de 100 pares de bases).

Para a combinação do par de *primers* AM87, os produtos de amplificação observados nos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 foram diferentes e com tamanho de 150 e 158 pares de bases, respectivamente (Figura 10). Apesar do polimorfismo molecular observado entre os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605, este não foi avaliado entre as linhagens recombinantes no presente estudo. Os produtos de amplificação para as diferentes combinações de pares de *primers* foram utilizados para a clonagem e sequenciamento.

Para a combinação de *primers* Ver-1.1, seqüências de 140 nucleotídeos foram obtidas para ambos os genitores de aveia UFRGS 8 e UFRGS 930605. O tamanho destes produtos de amplificação é equivalente ao observado em trigo,

para a região do primeiro éxon do gene *Vrn1*. Para o genitor UFRGS 8, oito seqüências foram clonadas, enquanto que para o genitor UFRGS 930605 foram seis seqüências foram clonadas.

	1																																	30		
U8a	A	A	G	C	G	G	A	T	C	G	A	G	A	A	C	A	A	G	A	T	C	A	A	C	C	G	C	C	A	G						
U6a	
U8b	
U6b	
Trigo	G	.	.	

	31																																		60		
U8a	G	T	C	A	C	C	T	T	C	T	C	C	A	A	G	C	G	C	C	G	C	T	C	C	G	G	C	T	T	G							
U6a	
U8b	.	.	G	G	.	.	.	G	.	G	A	G	.	.	G	C		
U6b	.	.	G	G	.	.	.	G	.	G	A	G	.	.	G	C		
Trigo	.	.	G	G	.	G	C	.	T	.	.			

	61																																		90		
U8a	C	T	C	A	A	G	A	A	G	G	C	G	C	A	C	G	A	G	A	T	C	T	C	C	G	T	G	C	T	C							
U6a	
U8b		
U6b		
Trigo	G		

	91																																		120		
U8a	T	G	C	G	A	T	G	C	C	G	A	G	G	T	C	G	G	C	C	T	C	A	T	C	A	T	C	T	T	C							
U6a	
U8b		
U6b		
Trigo	C		

	121																																		140	
U8a	T	C	C	A	C	C	A	A	G	G	G	A	A	A	G	C	T	C	T	A																
U6a	
U8b	
U6b	
Trigo	

FIGURA 11. Alinhamento da região do primeiro éxon (seqüência padrão) do gene *Vrn1*, amplificada pelo *primer* Ver-1.1. Identidade molecular à primeira seqüência do genitor UFRGS 8 (U8a) é representada por ponto. Bases dentro de quadrados representam SNP entre uma mesma seqüência (a ou b). Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), Trigo (*Triticum aestivum* L., acesso AY747600.1).

A partir do alinhamento dos produtos de amplificação de aveia obtidos com a combinação de *primers* Ver-1.1, foram identificadas duas seqüências (a e b) presentes em ambos os genitores (Figura 11). O número de seqüências "a" clonadas foi de sete e três, e de seqüências "b" clonadas foi de um e três para os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605, respectivamente. Nove SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) foram identificados entre as duas seqüências

denominadas “a” e “b”. Dois SNP foram identificados nas posições 90 e 108 entre as sequências “b” dos genitores. Ainda, foram identificados quatro marcadores SNP entre as sequências clonadas de aveia quando comparadas com a sequência de trigo (AY747600.1) (Figura 11). Entretanto, os SNP identificados nas diferentes sequências dos genitores não alterou a sequência de aminoácidos, nem quando comparadas à sequência de aminoácido do trigo (acesso AAW73221.1) (Figura 12).

	1	30
U8a	K R I E N K I N R Q V T F S K R R S G L L K K A H E I S V L	
U6b	
Trigo	
	31	46
U8a	C D A E V G L I I F S T K G K L	
U6b	
Trigo	

FIGURA 12. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente ao primeiro éxon do gene *Vrn1* amplificadas pelo par de *primers* Ver-1.1. Legenda: U8a (sequência “a” de UFRGS 8), U6b (sequência “b” de UFRGS 930605), Trigo (Proteína de *Triticum aestivum* L., acesso AAW73221.1).

A identidade molecular da sequência nucleotídica derivada do genitor UFRGS 8 (sequência U8a), foi de 98% com sequências parciais do gene *Vrn1* de *Lolium multiflorum* (GU071076.1) e *Festuca arundinacea* (FJ793194.1); de 97%, de *Hordeum vulgare* (AK376259.1); e de 96% de *Triticum aestivum* (HQ130483.2), disponíveis no GenBank. Já a identidade molecular da segunda sequência derivada do genitor UFRGS 8 (sequência U8b) foi de 94% com sequências parciais do gene *Vrn1* de *Triticum spelta* (KF939528.1), de *Secale cereale* (HQ730773.1), de *Lolium perenne* (JN969602.1) e de *Triticum aestivum* (HQ130483.2); e de 94% e 93% com sequências parciais de genes codificantes do fator de transcrição MADS-box de *Phyllostachys edulis* (KJ002722.1) e de *Brachypodium distachyon* (HQ130483.2), respectivamente.

As sequências clonadas pelo par de *primers* Ver-1.18 (região do terceiro ao quinto éxon do gene *Vrn1*) apresentaram 422 bases de nucleotídeos para ambos os genitores (Figura 13). O fragmento da mesma região do gene *Vrn1*, do genótipo UFRGS 881971 (HQ9110523), também apresenta 422 bases, enquanto que o fragmento do genótipo de trigo hexaplóide (AY747600.1) apresenta 441 bases (Figura 13). Foram obtidas oito e cinco sequências clonadas do genitor UFRGS 8 e do genitor UFRGS 930605, respectivamente.

Das oito sequências clonadas do genitor UFRGS 8, cinco foram similares entre si, e as outras três também foram similares entre si. Portanto, UFRGS 8 apresentou duas diferentes sequências amplificadas pelo mesmo par de *primers*. A sequência com o maior número de clones foi denominada “sequência a”, enquanto que a sequência com o menor número de clones foi denominada “sequência b”.

Das cinco sequências clonadas do genitor UFRGS 930605, quatro apresentaram similaridade entre si. Estas sequências, a partir do alinhamento, também foram similares à “sequência b” do genitor UFRGS 8. Portanto, essa sequência foi denominada de “sequência b” do genitor UFRGS 930605. A única sequência clonada sem similaridade com as outras sequências de UFRGS 930605 apresentou similaridade com a “sequência a” de UFRGS 8. Portanto, essa sequência foi denominada de “sequência a” do genitor UFRGS 930605.

	1		30																														
U8a	A	C	T	G	A	A	G	G	C	G	A	A	G	G	T	T	G	A	G	A	C	A	A	T	A	C	A	G	A	A			
U6a	
U71	W		
U8b	A	
U6b	A	
Trigo	
	31		60																														
U8a	A	T	G	T	C	A	A	A	A	G	T	A	A	T	T	C	G	T	A	G	T	G	A	T	T	T	T	T	A	C			
U6a	
U71	A	.	.	W	.	.	K		
U8b	G	T
U6b	A	G	T
Trigo	T	.	.	.	A	C	G	G	T
	61		90																														

U8a	T	G	G	T	T	G	C	C	A	G	T	A	T	G	A	C	G	T	A	T	A	T	T	C	T	G	T	T	A	A	
U6a
U71	Y	
U8b	T	A	
U6b	T	A	
Trigo	.	.	A	A	T	T	C	A	.	C	.	G	.
	91																													120	
U8a	G	A	T	A	T	A	T	G	T	G	A	-	T	G	G	A	C	T	T	A	C	A	C	A	T	T	C	T	G	C	
U6a	-	
U71	-	
U8b	-	A	G	
U6b	-	A	G	
Trigo	.	.	.	A	.	.	G	.	C	.	C	.	A	T	.	C	T	C		
	121																													150	
U8a	A	C	C	T	G	C	A	G	C	A	T	C	T	G	A	T	G	G	G	G	G	A	G	G	A	T	C	T	A		
U6a	
U71	R	
U8b	A	C	
U6b	A	C	
Trigo	.	T	C	A	T	
	151																													180	
U8a	G	A	A	T	C	T	T	T	G	A	A	T	C	T	T	A	A	A	G	A	G	T	T	G	C	A	G	C	A	A	
U6a	
U71	
U8b	.	G	
U6b	
Trigo	C	.	G	
	181																													210	
U8a	C	T	A	G	A	G	C	A	G	C	A	G	C	T	A	G	A	A	A	G	T	T	C	A	C	T	A	A	A		
U6a	
U71	
U8b	
U6b	
Trigo	.	G	G	G	
	211																													240	
U8a	C	A	T	A	T	C	A	G	A	T	C	C	A	G	A	A	A	G	G	T	A	G	A	A	A	T	-	-	-		
U6a	-	
U71	C	-		
U8b	-		
U6b	-		
Trigo	G	C	T	G	.	T	T	A	A	

FIGURA 13. Alinhamento do terceiro ao quinto éxon do gene *Vrn1* amplificado pelo par de *primers* Ver-1.18. As regiões da primeira sequência em negrito (U8a) representam éxons; circuladas representam locais de *splicing*; e as demais regiões representam íntrons. A identidade molecular à sequência U8a é representada por ponto, e ausência, por hífen. Bases dentro de quadrados representam SNP em regiões exônicas de um mesmo subgenoma entre diferentes genótipos. Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), U71 (UFRGS 881971, acesso HQ9110523), Trigo (*Triticum aestivum* L., acesso AY747600.1).

continuação FIGURA 13. Alinhamento do terceiro ao quinto éxon do gene *Vrn1* amplificado pelo par de *primers* Ver-1.18. As regiões da primeira sequência em negrito (U8a) representam éxons; circuladas representam locais de *splicing*; e as demais regiões representam íntrons. A identidade molecular à sequência U8a é representada por ponto, e ausência, por hífen. Bases dentro de quadrados representam SNP em regiões exônicas de um mesmo subgenoma entre diferentes genótipos. Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), U71 (UFRGS 881971, acesso HQ9110523), Trigo (*Triticum aestivum* L., acesso AY747600.1).

sequência “b” de UFRGS 8 amplificada pelo *primer* Ver-1.18, enquanto que a região sobreposta de UFRGS 930605 foi similar à sequência “a” de UFRGS 930605 amplificada pelo par de *primers* Ver-1.18. A sequência de aveia do genótipo UFRGS 881971 (HQ9110523) apresentou maior similaridade com a sequência “a” (Figura 13).

Foram identificados 19 SNP entre as sequências “a” e “b”; sendo 1 SNP na posição 28, localizado no terceiro éxon; 9 SNP localizados no terceiro íntron; 2 SNP, nas posições 141 e 150, localizados no quarto éxon; e 7 SNP, localizados no quarto íntron. Além de SNP entre as sequências “a” e “b”, também foram identificados SNP entre a sequência “a” de UFRGS 8, a sequência “a” de UFRGS 930605 e a sequência de UFRGS 881971. Quando comparadas essas sequências, foram identificados 3 SNP nas posições 48, 217 e 393, sendo que apenas a posição 217 localiza-se em região exônica. Esse SNP difere os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 do genótipo UFRGS 881971 (HQ9110523). Na sequência “b”, foram identificados 2 SNP entre os genitores de aveia nas posições 153 e 348, sendo que apenas a posição 153 está localizada em uma região exônica do gene. Este SNP difere o genitor UFRGS 8 do genitor UFRGS 930605. Os dois SNP localizados em regiões exônicas do gene *VRN1*, e que diferem genótipos de aveia, foram localizados no quarto éxon.

Em comparação com a sequência de trigo, as sequências de aveia apresentaram 87 variações de base. Em regiões intrônicas, houve 18 deleções e 1 inserção de base. As demais variações de base foram de SNP tanto em regiões intrônicas, quanto em regiões exônicas do gene *Vrn1* (Figura 13). Assim como para a região amplificada pela combinação de *primers* Ver-1.1, não houve diferença entre as sequências de aminoácidos do quarto éxon do gene *Vrn1* dos genótipos de aveia e de trigo quando alinhadas (Figura 14).

Trigo	. . . T C . A T C A G C . . -
	533 562
U6	T T T C A A G T T T T A T G G A A T T A T A G C A T G T A C
U8	. T
U7	. .
Trigo A G . . . A C A T
	563 592
U6	G T A T G C A A G T A C T C T G T A C T T G C A G A A A C C
U8	. G
U7	. .
Trigo	. C . A . T . . C . G G . . . A C . T G C A . - . T
	593 622
U6	T C A T T A C C T C G T T C T T G G T G C <u>A G</u> G A G A G G T
U8	. .
U7	. .
Trigo	. A C
	623 638
U6	C A C T G C A G G A G G A G A A
U8	. .
U7	. .
Trigo	. .

FIGURA 15. Alinhamento do quinto ao sexto éxon do gene *Vrn1* amplificado pelo par de *primer* Ver-1.19. A região da sequência U6 em negrito representa o éxon; circulada representa local de *splicing*, e as demais representam íntrons. A identidade molecular à sequência U6 é representada por ponto, e ausência, por hífen. Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), U71 (UFRGS 881971, acesso HQ910519), Trigo (*Triticum aestivum* L., acesso AY747600).

No alinhamento, o mesmo número de bases é observado para o genótipo de aveia UFRGS 881971 (HQ910519), enquanto que para o genótipo de trigo (AY747600.1) são observadas 194 bases. O alinhamento apresentou 3 SNP entre as sequências de aveia, sendo todos SNP em regiões intrônicas do gene. Além dos SNP identificados entre os genótipos de aveia, 41 variações de base foram observadas entre os genótipos de aveia e de trigo (AY747600.1). Duas deleções de base foram identificadas no quinto íntron da sequência de trigo, enquanto que as demais variações de base foram de SNP, principalmente em regiões intrônicas do gene (Figura 15).

A identidade molecular da sequência derivada do genitor UFRGS 930605 (U6) foi de 100% com sequências parciais do gene *Vrn1* de *Avena sativa* (HQ910527.1); de 92% de *Hordeum vulgare* (AY887088.1); de 86%, de *Aegilops speltoides* (DQ291123.1); e de 80% de *Triticum aestivum* (AY747606.1) e de *Triticum durum* (JX020751.1), disponíveis no GenBank.

As regiões exônicas do gene *Vrn1* não apresentaram variação de tamanho entre as espécies de aveia e trigo (Figura 16).

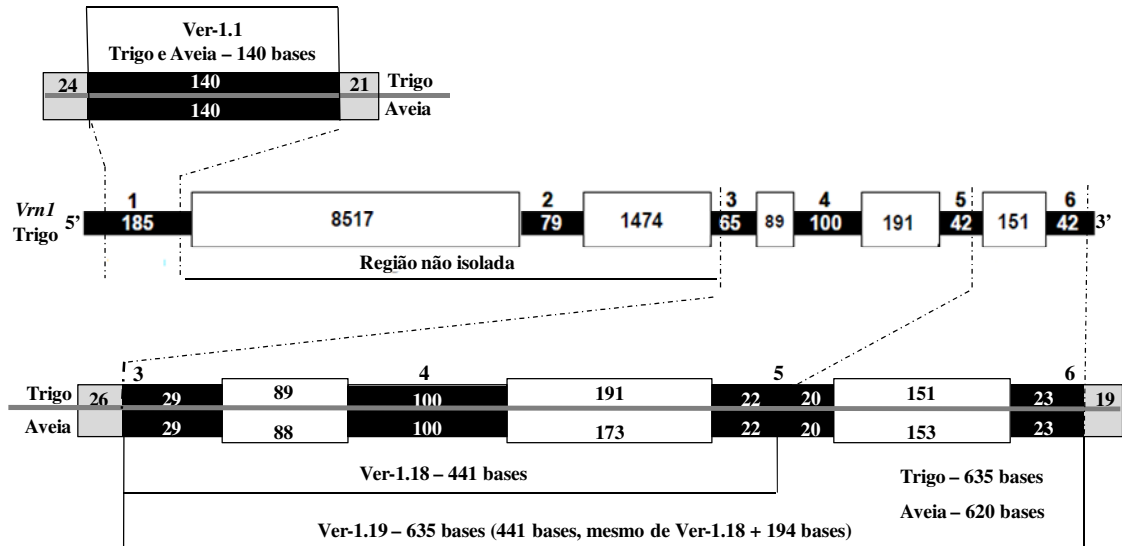


FIGURA 16. Comparação do tamanho de fragmento amplificado pelos pares de *primers* Ver-1.1 e Ver-1.19 do gene *Vrn1* dos genitores de aveia e do genótipo de trigo (AY747600). Os números dentro dos retângulos correspondem ao número de bases de cada segmento de DNA. Os retângulos brancos representam íntrons, e os retângulos pretos e cinzas representam éxons. Na figura superior e inferior, os retângulos cinzas representam regiões exônicas não amplificadas. A linha cinza separa as sequências do gene *Vrn1* das espécies de aveia e trigo.

Apenas nas regiões intrônicas amplificadas pelas combinações dos pares de *primers*, houve variação no número de bases entre as espécies. O terceiro íntron apresentou uma deleção de base; o quarto, 16 deleções; e o quinto, 2 inserções de bases na espécie de aveia em comparação com a espécie de trigo (AY747600.1) (Figura 16).

Para a combinação de primers AM87, o tamanho das sequências clonadas dos genitores foi distinto. O genitor UFRGS 8 apresentou dois tamanhos de fragmentos amplificados, de 150 e 152 bases, enquanto que o genitor UFGRGS 930605 apresentou apenas um tamanho de fragmento, de 158 bases (Figura 17). Foram obtidas sete sequências do genitor UFRGS 8 com tamanho de 150 bases

(U8a), sete sequências do genitor UFRGS 8 com tamanho de 152 bases (U8b), e 14 sequências do genitor UFRGS 930605 com tamanho de 158 bases (U6).

	1		30																																		
U8a	G	A	G	C	A	A	G	C	T	C	T	G	G	A	T	G	G	A	A	A	T	A	C	A	T	T	G	C	A	C							
U8b					
U6						
	31		60																																		
U8a	A	T	C	A	G	G	G	A	T	C	G	A	T	C	A	A	C	T	C	C	A	C	A	G	T	C	C	C	T	T							
U8b	C	.					
U6						
	61		90																																		
U8a	T	T	G	A	A	A	G	A	T	A	C	A	T	G	T	T	A	A	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C							
U8b						
U6						
	91		120																																		
U8a	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	C	T	G	T	A			
U8b
U6
	121		150																																		
U8a	G	C	T	A	T	G	A	T	G	A	A	T	C	T	G	A	T	G	C	T	A	A	C	A	A	C	C	A	C	A							
U8b
U6
	151		158																																		
U8a	T	A	A	A	C	G	G	G																													
U8b
U6

FIGURA 17. Alinhamento das sequências da região amplificada pelo par de *primers* AM87 dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605. A sequência em negrito representa a região microssatélite do marcador AM87. A identidade molecular à primeira sequência (U8a) é representada por ponto, e ausência de alinhamento é representada por hífen. Os quadrados representam *indel* entre as sequências alinhadas. Legenda: U8 (UFRGS 8), U6 (UFRGS 930605), “a” (150 bases), “b” (152 bases).

Uma vez que a sequência amplificada pela combinação de *primers* AM87 representa uma região microssatélite específica de aveia e que não havia sido previamente sequenciada, nenhuma identidade molecular foi observada, quando comparada com sequências disponíveis nos bancos de dados moleculares.

Varição no número de sequências repetidas adjacentes “AC” foi observada tanto entre diferentes sequências do genitor UFRGS 8, quanto entre as sequências clonadas dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605. Para o genitor UFRGS 8, a sequência U8a apresentou 13 repetições “AC”, enquanto que a

sequência U8b apresentou 14 repetições “AC”. A sequência de UFRGS 930605 apresentou 17 repetições “AC” (Figura 17).

5 DISCUSSÃO

Os sinais ambientais de fotoperíodo e temperatura variaram entre as épocas de semeadura avaliadas. A série histórica climática de 1970 a 2012 da Estação Experimental Agronômica (EEA) indica a ocorrência de fotoperíodo curto, assim como de temperaturas menores na estação de crescimento da semeadura do cedo (Bergamaschi *et al.*, 2013). Portanto, nessa época de semeadura há uma maior ocorrência de fotoperíodo não indutivo ao florescimento da aveia, porém apresenta condições mais efetivas de vernalização.

No presente estudo, a época de semeadura do cedo apresentou uma maior ocorrência de temperaturas de vernalização (Tabela 2), assim como de fotoperíodo curto (Tabela 3). Portanto, estas condições ambientais, especialmente de baixas temperaturas, devem ter contribuído em algum grau para a competência ao florescimento em linhagens recombinantes que respondem à vernalização. No estudo realizado por Holland *et al.* (2002) conduzido em Iowa, Estados Unidos, foi considerado que plantas semeadas no início do mês de abril apresentaram maior grau de satisfação do requerimento de vernalização, quando comparadas a plantas semeadas 15 dias após à primeira semeadura.

No presente estudo as condições não-indutivas de fotoperíodo (fotoperíodo curto), observadas na época de semeadura do cedo, permitiram identificar as linhagens recombinantes que apresentam sensibilidade ao fotoperíodo longo e linhagens que não apresentam resposta ao fotoperíodo longo. As linhagens

recombinantes sensíveis ao fotoperíodo longo apresentaram elevado NDEF, devido à necessidade da percepção do sinal de fotoperíodo indutivo para o florescimento. Já as linhagens recombinantes insensíveis ao fotoperíodo longo apresentaram baixo NDEF, pois necessitavam apenas atingir a soma térmica mínima para o florescimento. No estudo realizado por Locatelli *et al.* (2008), a principal causa da diferença do florescimento dos genótipos na época de semeadura do cedo também foi atribuída à variação de resposta ao fotoperíodo.

Ainda na semeadura do cedo, no ano de 2014, o acúmulo de soma térmica do ar (Tabela 2), necessário para induzir o florescimento em UFRGS 8, foi atingido mais rapidamente quando comparado ao ano de 2013. Isso é verificado na Tabela 5, onde o genitor UFRGS 8 apresentou menor NDEF no ano de 2014, quando comparado ao ano de 2013. No estudo de Karow *et al.* (1993), o desenvolvimento vegetativo até o florescimento foi associado com a soma térmica do ar em cereais de inverno, como trigo e cevada. A maior soma térmica do ar diminuiu o período da fase vegetativa das plantas.

Entretanto, para o genitor UFRGS 930605, o NDEF foi maior em 2014, ao contrário do NDEF do genitor UFRGS 8 (Tabela 5). A sensibilidade ao fotoperíodo longo do genitor UFRGS 930605 pode ser considerada uma das causas para a não redução do NDEF observado neste genótipo. Apesar do maior acúmulo da soma térmica do ar em 2014, o genitor UFRGS 930605 ainda necessitou do sinal de fotoperíodo indutivo para o florescimento. Já o menor número de dias efetivos de vernalização no ano de 2014 pode ter influenciado no aumento do NDEF do genitor UFRGS 930605. Neste ano, a satisfação do requerimento de vernalização desse genitor pode não ter sido atingida no mesmo grau que no ano de 2013.

Na época de semeadura do tarde, a séria histórica climática da Estação Experimental Agrônômica da UFRGS indica a ocorrência de temperaturas

maiores, como também, de fotoperíodo indutivo ao florescimento da aveia, ao contrário do que ocorre na época de semeadura do cedo (Bergamaschi *et al.*, 2013). No presente estudo, a avaliação das linhagens recombinantes em duas épocas de crescimento distintas, em um mesmo ano, teve como objetivo mensurar a diferença no número de dias da emergência ao florescimento (NDEF), de uma mesma linhagem recombinante, quando submetida a diferentes regimes de fotoperíodo e temperatura.

A época de semeadura do tarde apresentou fotoperíodo crescente (Tabela 3), e poucos dias efetivos de vernalização (Tabela 2). Linhagens sensíveis à vernalização atrasaram o florescimento devido à menor satisfação do requerimento de vernalização nessa época de semeadura. No entanto, a diferença do florescimento entre as linhagens recombinantes foi menor, quando comparada à época de semeadura do cedo. Estes resultados podem ser explicados pelo maior acúmulo da soma térmica do ar em um menor período de tempo observado, como também pela maior ocorrência de fotoperíodo indutivo na época de semeadura do tarde.

As frequências observadas do NDEF das linhagens recombinantes estão distribuídas em um menor número de classes na época de semeadura do tarde em comparação à época de semeadura do cedo, nos dois anos avaliados (Figura 3 e 4). Essa menor diferença entre genótipos na época de semeadura do tarde (devido ao maior acúmulo de soma térmica do ar), também foi observada no estudo conduzido por Locatelli *et al.* (2008).

Apesar das frequências fenotípicas do NDEF distribuírem-se em um menor número de classes na época de semeadura do tarde, a amplitude do NDEF das diferentes épocas de semeadura não apresentou variação, nos dois anos em que as linhagens foram avaliadas. Nas diferentes épocas de semeadura e anos, as

últimas classes na distribuição de frequência do NDEF apresentaram menos que cinco linhagens recombinantes, as quais foram responsáveis em manter a mesma amplitude de variação do NDEF entre épocas de semeadura (Figura 3 e 4).

Quando os resultados das diferentes épocas de semeadura foram comparados entre os anos de 2013 e 2014, uma maior frequência de linhagens recombinantes e uma maior dispersão do NDEF foram observadas, considerando a mediana como ponto de referência (Figura 5). Desta forma, a variação fenotípica observada entre as linhagens recombinantes, nas diferentes épocas de semeadura e anos, deve estar associada com: i) diferentes níveis de requerimento de vernalização e fotoperíodo *per se* entre linhagens ii) interações epistáticas em genes envolvidos no controle do requerimento de vernalização e fotoperíodo e, iii) das variações ambientais ocorridas durante o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Resultados similares foram observados em linhagens recombinantes com sensibilidade à vernalização, as quais apresentaram maior NDEF, como também, maior dispersão do NDEF (Nava, 2008). Neste estudo, as possíveis causas da maior dispersão foram atribuídas à presença de genes de florescimento com efeito menor e/ou modificadores; ausência de alelos dominantes do gene *Vrn1*; presença de locos gênicos associados à vernalização com heterozigose residual, e erros de leitura de florescimento.

As linhagens recombinantes apresentaram relação similar quanto à duração do ciclo vegetativo nas duas épocas de semeadura (Figura 6). A relação positiva entre o NDEF da época de semeadura do cedo e o NDEF da época de semeadura do tarde, indica que a causa da variação do NDEF entre as linhagens recombinantes pode não ser devido a diferenças na resposta ao fotoperíodo nem à vernalização.

Os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 já foram previamente caracterizados para o florescimento em nível fenotípico e genotípico. No estudo de Locatelli *et al.* (2008), o genitor UFRGS 8 apresentou insensibilidade ao fotoperíodo. Tanto em condições de fotoperíodo curto (não indutivo) como em condições de fotoperíodo longo (indutivo), o genitor UFRGS 8 foi mais precoce em comparação ao genitor UFRGS 930605. Em outro estudo realizado por Locatelli *et al.* (2006), foi sugerido que ambos os genótipos UFRGS 8 e UFRGS 930605 apresentem o gene de insensibilidade ao fotoperíodo *Di1*, e que o genitor UFRGS 8, além do gene *Di1*, apresente QTLs de pequeno efeito envolvidos na insensibilidade ao fotoperíodo. Além do fotoperíodo, outros fatores provavelmente determinaram o florescimento do genitor UFRGS 930605 em condições de campo (Locatelli *et al.*, 2008). Em Nava *et al.* (2012), o genitor UFRGS 930605 apresentou, além da resposta ao fotoperíodo, resposta à vernalização.

A resposta à vernalização do genitor UFRGS 930605 foi caracterizada nos estudos de Locatelli *et al.* (2008) e de Nava *et al.* (2012) sob diferentes regimes de fotoperíodo. No primeiro estudo, a resposta à vernalização foi avaliada sob fotoperíodo curto, enquanto que no segundo estudo, sob fotoperíodo longo. As plantas vernalizadas no primeiro estudo não apresentaram resposta à vernalização, enquanto que as plantas vernalizadas no segundo estudo anteciparam o florescimento em 15 dias em comparação com as plantas não vernalizadas.

Isto sugere que a resposta à vernalização do genitor UFRGS 930605 foi dependente do regime de fotoperíodo. As plantas quando expostas ao fotoperíodo curto não necessitaram da vernalização. Essa perda da necessidade da vernalização pela exposição ao fotoperíodo curto é observada em outras espécies gramíneas de inverno da subfamília Festucoideae (Heide, 1994), como também

na espécie silvestre de trigo *Triticum monococcum* L. (Dubcovsky *et al.*, 2006) e de *Brachypodium distachyon* (Ream *et al.*, 2014). Estas duas últimas espécies pertencem à mesma subfamília de aveia, a Pooideae. A dependência do fotoperíodo curto e da vernalização pode estar associada ao gene *Vrn2*, principal repressor do florescimento. Em dias curtos, *Vrn2* é reprimido, não atuando mais como repressor de *Vrn3*, principal promotor do florescimento em gramíneas (Dubcovsky *et al.*, 2006).

Para todas as linhagens recombinantes foi observada RSC negativa nos dois anos avaliados, indicando que o florescimento de todas as linhagens recombinantes foi antecipado na época de semeadura do tarde (Figura 7 e 8). Em um estudo similar realizado por Nava *et al.* (2012), em condições de cultivo do Canadá, resposta à semeadura no cedo (RSC) tanto positiva, quanto negativa foram observadas. A RSC positiva foi relacionada a genótipos sensíveis à vernalização, uma vez que o florescimento foi antecipado na época de semeadura do cedo, na qual um maior número de dias efetivos de vernalização foi registrado. Já a RSC negativa foi relacionada a genótipos sensíveis ao fotoperíodo e à soma térmica, uma vez que houve antecipação do florescimento na época de semeadura do tarde, favorecida pelas condições indutivas de fotoperíodo e temperaturas mais elevadas.

Todavia, a separação das linhagens recombinantes de acordo com a sensibilidade ao fotoperíodo e à vernalização não foi possível no presente estudo. Neste trabalho, a diferença de 45 dias entre a data de semeadura das diferentes épocas, em comparação com a diferença de 15 dias, no trabalho desenvolvido por Nava *et al.* (2012) promoveu maiores diferenças das condições ambientais durante o crescimento das plantas. A ocorrência de condições indutivas de fotoperíodo e elevada temperatura do ar em que as plantas foram submetidas na

época de semeadura do tarde, foram suficientes para antecipar o florescimento de todas as linhagens recombinantes, independente do requerimento de vernalização. Portanto, os resultados sugerem que nestas condições, houve a sobreposição da rota de resposta ao fotoperíodo sobre a rota de resposta à vernalização. A rota de resposta ao fotoperíodo foi determinada em uma era geológica anterior à rota de resposta à vernalização, e por esse motivo, essa última rota é considerada sobreposta à rota de resposta ao fotoperíodo (Amasino, 2010).

Apesar de todas as linhagens recombinantes apresentarem RSC negativa, foi observada uma associação entre a RSC com o NDEF das linhagens recombinantes. Na época de semeadura do tarde, linhagens precoces (baixo NDEF) anteciparam menos o florescimento, em comparação às linhagens tardias (elevado NDEF) (Figura 9). A relação entre a RSC e o NDEF foi evidente apenas na época de semeadura do cedo, e não na época de semeadura do tarde. A menor diferença entre o NDEF das linhagens recombinantes observada na época de semeadura do tarde pode ser o motivo da falta de relação entre o NDEF e a RSC nessa época de semeadura. A presença de variação entre os valores da RSC das linhagens recombinantes indica a existência de variação de resposta às condições ambientais de cultivo.

Uma maior proporção de linhagens recombinantes foi classificada como insensível ao fotoperíodo e à vernalização, semelhante ao genitor UFRGS 8 (Tabela 6). De maneira similar, em Nava *et al.* (2012) foi observado uma maior frequência de linhagens insensíveis à vernalização em comparação às linhagens sensíveis à vernalização. A comparação das frequências observadas e esperadas permitiu que os autores não rejeitassem a hipótese de dois genes controlando a resposta à vernalização em aveia.

A comparação de médias do NDEF e dos valores da RSC (Tabela 8) distinguiram as linhagens recombinantes classificadas quanto à sensibilidade ao fotoperíodo e à vernalização. As linhagens classificadas como sensíveis apresentaram NDEF maior nas duas épocas de semeadura, indicando serem de ciclo tardio, como também RSC menor. A RSC menor indica maior diferença na duração do ciclo da planta, quando a mesma linhagem é exposta a diferentes condições ambientais (época de semeadura do cedo e época de semeadura do tarde). Portanto, a menor RSC indica que estas linhagens são mais sensíveis às variações ambientais. Estes resultados são consistentes aos resultados observados para os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605. O genitor UFRGS 8 apresentou menor NDEF e maior RSC, enquanto que o genitor UFRGS 930605, o qual apresenta sensibilidade ao fotoperíodo e à vernalização, exibiu maior NDEF e menor RSC (Tabela 5).

As linhagens recombinantes classificadas como insensíveis ao fotoperíodo e à vernalização foram associadas a um NDEF menor, indicando serem de ciclo precoce; como também, a uma RSC maior, portanto menos sensíveis a variações ambientais (Tabela 8). O genitor UFRGS 8, insensível aos sinais de fotoperíodo e vernalização, também foi associado a um baixo NDEF e a um alto valor de RSC (Tabela 5).

As linhagens classificadas como intermediárias apresentaram NDEF entre o NDEF superior e inferior; exceto na semeadura do tarde, na qual o NDEF das linhagens intermediárias não diferiu do menor valor de NDEF das linhagens recombinantes insensíveis (Tabela 8). O fenótipo intermediário pode estar associado a diferentes alelos envolvidos no florescimento, provenientes de ambos os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605.

Os programas de melhoramento visam à obtenção de cultivares de aveia precoce (baixo NDEF), de baixo porte e de alto rendimento. O rendimento está associado a um alto peso de panícula e a um baixo comprimento de panícula (Mariot *et al.*, 1999). Por esse motivo, foi avaliada a correlação entre o NDEF, a RSC e os componentes de rendimento de estatura de plantas, peso de panícula e comprimento de panícula da população em estudo.

Na semeadura do cedo (que simula uma época de cultivo utilizada pelos agricultores) a correlação positiva entre o NDEF com o comprimento de panícula e com a estatura de plantas (Tabela 9), sugere que linhagens precoces - menos responsivas aos fatores ambientais - apresentem melhores rendimentos que linhagens tardias, como também porte mais baixo. Entretanto, a falta de correlação do NDEF com o peso de panícula indica que a diferença observada do comprimento de panícula e da estatura de plantas não seja suficiente na possível variação de rendimento entre as linhagens recombinantes.

Na época de semeadura do tarde, a correlação entre NDEF e os componentes do rendimento foi ainda menor (Tabela 9). A menor correlação obtida entre o NDEF e as outras variáveis avaliadas pode ser devido à menor variação do NDEF entre as linhagens recombinantes. A correlação obtida do NDEF do cedo e do tarde com as variáveis de rendimento avaliadas indica que essa população não apresenta grande variação de rendimento, apesar de haver diferenças entre o NDEF das linhagens recombinantes. Portanto, apenas o NDEF pode ser considerado como principal critério de seleção para esta população.

A análise fenotípica do florescimento demonstrou a existência de variação genética do NDEF entre as linhagens recombinantes avaliadas. Entretanto, a variação genética provavelmente está na resposta à soma térmica, ou em alguma rota de resposta que integre a resposta de ambos os fatores ambientais de

fotoperíodo e vernalização, devido a relação da duração do ciclo vegetativo das linhagens recombinantes não variar entre épocas de semeadura (Figura 6).

A sensibilidade à vernalização em trigo é determinada por três alelos do gene *Vrn1*: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* e *Vrn-D1*. Genótipos sensíveis apresentam locos gênicos em homozigose recessiva para os três alelos, enquanto que genótipos insensíveis devem apresentar pelo menos um alelo dominante. O alelo dominante do gene *Vrn-A1* confere insensibilidade completa à vernalização, e apresenta epistasia aos alelos dominantes dos locos *Vrn-B1* e *Vrn-D1*, que conferem menor sensibilidade à vernalização em homozigose recessiva (Iqbal *et al.*, 2007).

Da mesma forma que em trigo, a aveia cultivada também apresenta genoma alohexaplóide (Loskutov, 2008). Por esse motivo, foi proposto que variações alélicas do gene *Vrn1* entre os diferentes genitores poderiam estar envolvidas na determinação do florescimento. Desta forma, a análise molecular foi realizada para a identificação de variações entre sequências do gene *Vrn1*, derivadas dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605.

Para a combinação de *primers* Ver-1.1, a qual amplificou uma região do primeiro éxon do gene *Vrn1* em aveia, foram identificadas duas variações de sequência presentes em ambos os genitores (Figura 11). Isso sugere a presença de dois alelos distintos do gene *Vrn1* em diferentes subgenomas nesses genótipos. O primeiro alelo quando alinhado (U8a) apresentou maior identidade molecular com o gene *Vrn-B1* de *Triticum aestivum* L. (Shcherban *et al.*, 2012), enquanto que a segunda variação alélica (U8b) apresentou maior identidade molecular ao gene *Vrn-D1* de *Triticum spelta* (Muterko *et al.*, 2015).

Entretanto, quando as sequências de nucleotídeos foram traduzidas para sequências de aminoácidos, não foram identificadas mudanças de aminoácidos Tanto entre sequências de diferentes subgenomas, quanto entre sequências do

mesmo subgenoma de genótipos diferentes (Figura 12). Isso sugere que a proteína codificada no primeiro éxon foi a mesma para todas as sequências independente dos SNP identificados. Por esse motivo, a diferença do florescimento entre os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 não deve estar associada a diferenças do primeiro éxon do gene *Vrn1*.

A alta identidade molecular das sequências de aveia clonadas neste estudo, com sequências parciais do gene *Vrn1* de outras espécies gramíneas, sugere que os genes *Vrn1* de aveia e gramíneas tenham a mesma origem ancestral. A espécie modelo para estudos genéticos em gramíneas, *Brachypodium distachyon*, foi uma das espécies com sequência similar a região amplificada da região do primeiro éxon do gene *Vrn1* de aveia (Wei *et al.*, 2014).

Apesar de *Brachypodium distachyon* possuir o gene *Vrn1* ortólogo ao das gramíneas, as rotas de resposta à vernalização dessa espécie não devem estar conservadas com as rotas de trigo e cevada. Por exemplo, em *Brachypodium distachyon*, nenhum gene ortólogo ao gene *Vrn2* de trigo e cevada foi identificado (Ream *et al.*, 2014). De forma similar, nenhuma sequência com elevada similaridade ao gene *Vrn2* de trigo e cevada foi identificada em aveia (Nava *et al.*, 2012). No presente estudo, a alta similaridade do primeiro éxon com uma região do gene *Vrn1* de *Brachypodium distachyon* sugere que os mecanismos envolvidos na resposta à vernalização nesta espécie e aveia sejam similares.

Na análise molecular das sequências do gene *Vrn1* amplificadas pelos pares de *primers* Ver-1.18 e Ver -1.19 também foi considerado o genótipo UFRGS 881971. No estudo realizado por Locatelli *et al.* (2008), este genótipo apresentou grande resposta à vernalização. Plantas vernalizadas do genótipo anteciparam 13 dias o florescimento em relação às plantas não vernalizadas.

Para a combinação de *primers* Ver-1.18, a qual amplificou uma região do terceiro ao quinto éxon do gene *Vrn1* de aveia, também foram identificadas duas variações alélicas presentes em ambos os genitores (Figura 13). Entretanto, a sequência de aminoácidos traduzida da região do quarto éxon (SNP entre diferentes genitores em região exônica do mesmo subgenoma) não apresentou diferenças, nem mesmo com a sequência de *Triticum aestivum* L. (AAW73221.1) (Figura 14). Assim como para a combinação do par de *primers* Ver-1.1, as variações nucleotídicas observadas entre as sequências dos genitores, na região do gene *Vrn1* amplificada pelo par de *primers* Ver-1.18 não deve ser responsável pela variação fenotípica do florescimento.

A alta identidade molecular das sequências amplificadas pelo par de *primers* Ver-1.18 com sequências do gene *Vrn1* de diversas gramíneas de inverno, também sugere que a ancestralidade do gene *Vrn1* é a mesma entre gramíneas, e que possivelmente preserva a mesma função nas plantas. Os dois alelos identificados (U8a e U8b) apresentaram identidade molecular de 86% com sequências parciais de diferentes locos do gene *Vrn1* em diferentes espécies. O alelo *Vrn-A1* de *Triticum durum* (Chen & Dubcosky, 2012), o *Vrn-B1* de *Hordeum vulgare* (GI DQ291126.1) e o *Vrn-D1* de *Aegilops tauschii* (Takumi *et al.*, 2011) apresentam alta identidade molecular às sequências de aveia clonadas no presente estudo.

As sequências clonadas do gene *Vrn1*, provenientes da região amplificada apenas pela combinação de *primers* Ver-1.19 (entre o quinto ao sexto éxon), apresentou dois SNP na região do quinto íntron, entre os genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 (Figura 15). A identificação de SNP em regiões intrônicas provavelmente não seria a causa da diferença no florescimento observada entre os genitores, uma vez que essa região não participa na codificação da proteína. A

identidade molecular de 80% da sequência U6 com o alelo *Vrn-A1* (Fu *et al.*, 2005), e com sequências parciais do gene *Vrn1* de diversas espécies de gramíneas também sugere a conservação da função e estrutura do gene *Vrn1* ao longo da evolução.

Os polimorfismos moleculares detectados a partir das diferentes combinações de pares de *primers* (Ver-1.1, Ver-1.18 e Ver-1.19), do gene *Vrn1* dentro e entre sequências dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605, não contribuíram para a síntese de produtos gênicos diferentes entre os genitores. Desta forma, as regiões do gene *Vrn1* amplificadas, clonadas e sequenciadas nos genitores não explicam as variações fenotípicas observadas para o caráter florescimento nos mesmos. Desta forma, não seria possível determinar se existe associação entre a variação fenotípica observada nas linhagens recombinantes avaliadas em diferentes épocas de semeadura e anos, com as variações alélicas das regiões exônicas do gene *Vrn1* analisadas neste estudo. Todavia, variações alélicas importantes podem estar presentes no segundo éxon do gene *Vrn1* e que não foram analisadas.

A comparação do tamanho de fragmento amplificado pelos pares de *primers* ancorados no gene *Vrn1* entre as espécies de trigo e aveia sugere uma alta conservação da estrutura e função do gene *Vrn1* (Figura 16). Apenas regiões intrônicas apresentaram mudança no número de bases, enquanto que o tamanho das regiões exônicas amplificadas foi o mesmo para as duas espécies comparadas. Apesar, do tamanho das sequências intrônicas variarem entre aveia e trigo, esta variação foi de no máximo 16 nucleotídeos na região do quarto íntron.

As sequências clonadas dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605, provenientes da amplificação do par de *primers* AM87 apresentaram variação no número de repetições das bases adjacentes simples “AC” (Figura 17). Duas

variações foram identificadas para o genitor UFRGS 8, enquanto que, para o genitor UFRGS 930605, todas as sequências analisadas apresentaram o mesmo número de repetições simples “AC”. De acordo com os estudos prévios de mapeamento comparativo entre aveia e outras espécies de gramíneas, o marcador AM87 pode representar uma região microssatélite ligada ao gene *Vrn1* (Nava *et al.*, 2012). Para a mesma população UFRGS 8 x UFRGS 930605, os resultados obtidos por Nava *et al.* (2012) demonstraram que o marcador AM87 está localizado no grupo de ligação “6”, e que o alelo proveniente de UFRGS 8 influencia na determinação do florescimento. Desta forma, as variações moleculares observadas nas sequências da região microssatélite AM87, sugerem que estas variações podem estar envolvidas no florescimento em aveia.

A população em estudo demonstrou variação do florescimento quando semeadas em um mesmo local. Entretanto, não foi possível determinar se há ou não efeito em resposta ao fotoperíodo e à vernalização. Como o genitor UFRGS 930605 apresenta resposta à vernalização dependente do regime de fotoperíodo, provavelmente as linhagens recombinantes também apresentem esta interação. Em futuros trabalhos, será importante determinar o efeito do fotoperíodo na resposta à vernalização, e vice-versa desta população. A determinação do efeito da soma-térmica na resposta ao fotoperíodo e à vernalização também contribuirá para um maior entendimento dos principais fatores ambientais envolvidos no florescimento.

Os resultados moleculares sugerem que provavelmente o gene *Vrn1* não apresenta variação significativa para causar diferença no florescimento da população de linhagens recombinantes em estudo. Entretanto, é necessário avaliar todas as regiões exônicas do gene *Vrn1* para comprovar ou não esta hipótese. Os dados moleculares também sugerem a presença de mais um alelo do gene *Vrn1*

em um mesmo genótipo de aveia. Esta constatação pode ser ou não corroborada a partir do sequenciamento das espécies diploides de aveia silvestre, as quais deram origem à aveia branca cultivada. Esse trabalho já vem sendo executado pela Universidade Brigham Young, em Utah, Estados Unidos.

A determinação da causa genética da diferença do florescimento dos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605 poderá auxiliar na seleção de genótipos com maior adaptação em uma determinada área de cultivo de aveia. Entretanto é necessário que se identifique no genitor UFRGS 930605 um marcador ligado à uma resposta a um sinal ambiental, ou a alguma interação de fatores ambientais.

6 CONCLUSÕES

Linhagens recombinantes tardias apresentaram maior variação de resposta aos sinais ambientais quando comparadas às linhagens recombinantes precoces.

O requerimento à vernalização em linhagens recombinantes de aveia foi suprimido nas condições de fotoperíodo longo e temperaturas elevadas.

A análise molecular revelou a existência de pelo menos duas variações alélicas do gene *Vrn1* presente nos genitores UFRGS 8 e UFRGS 930605. Entretanto, ainda é necessário avaliar a contribuição dessas variações alélicas na variação do florescimento.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science**, Washington, v.309, n.5737, p.1052-1056, 2005.
- AMASINO, R.M. Vernalization competence, and epigenetic memory of winter. **The Plant Cell**, California, v.16, n.10, p.2553-2559, 2004.
- AMAZINO, R.M. Seasonal and developmental timing of flowering. **The Plant Journal**, Oxford, v.61, n.6, p.1001-1013, 2010.
- ANDRÉS, F.; COUPLAND, G. The genetic basis os flowering responses to seasonal cues. **Nature Reviews Genetics**, Rhineland, v.13, n.9, p.627-639, 2012.
- BERGAMASCHI, H. (Org.) et al. **Boletim agrometeorológico da Estação Experimental Agronômica da UFRGS. Série histórica 1970 – 2012**. Porto Alegre, v.1, n.1 p.1-8, 2013.
- BERNIER, G. et al. **The physiology of flowering**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1981.
- BLACKMAN, B. et al. The role of recently derived FT paralogs in sunflower domestication. **Current Biology**, Cambridge, v.20, n.7, p.629-635, 2010.
- BORNER, R. et al. A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v.24, n.5, p.591-599, 2000.
- CAIERÃO E. et al. Seleção indireta em aveia para o incremento no rendimento de grãos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p.231-236, 2001.
- CHARDON, F.; DAMERVAL, C. Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.1, n.1, p.579-590, 2005.
- CHEN, A.; DUBCOVSKY, J. Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene VRN1 down-regulates the flowering repressor VRN2 in leaves but is not essential for flowering. **PLOS genetics**, Cambridge, v.8, n.12, p.134-147, 2012.
- CHOI, J. et al. Resetting and regulation of FLOWERING LOCUS C expression during Arabidopsis reproductive development. **The Plant Journal**, Oxford, v.57, n.5, p.918-931, 2009.

CHOI, K. et al. The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in Arabidopsis, by recruiting chromatin modification factors. **The Plant Cell**, California, v.23, n.1, p.289-303, 2011.

CHOUARD, P. Vernalization and its relations to dormancy. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.11, n.1, p.191-238, 1960.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Série histórica de área, produtividade e produção de aveia**. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br> >. Acesso em: Jun.2015.

DE LUCIA, F. et al. A PHD-Polycomb Repressive Complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.105, n.44, p.16831-16836, 2008.

DISTELFELD, A. et al. Regulation of flowering in temperate cereals. **Current Opinion in Plant Biology**, Missouri, v.12, n.2, p.178-184, 2009.

DOI, K. et al. Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. **Genes & Development**, New York, vol.18, n.8, p.926-936, 2004.

DUBCOVSKY, J. et al. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes VRN1 and VRN2. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.60, n.4, p.469-480, 2006.

FEDERIZZI, L.C. et al. URS Brava – a new oat cultivar with partial resistance to crown rust. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Porto Alegre, v.15, n.1, p.197-202, 2015.

FERRÁNDIZ, C. et al. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. **Development**, Cambridge, v.127, n.4, p.725-734, 2000.

FJELHEIM, S. et al. The role of seasonal flowering responses in adaptation of grasses to temperate climates. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.5, n.1, p.431-446, 2014.

FRIEDMAN, J.; WILLIS, J.H. Major QTLs for critical photoperiod and vernalization underlie extensive variation in flowering in the *Mimulus guttatus* species complex. **New Phytologist**, Bristol, v.199, n.2, p.571-583, 2013.

FU, D. et al. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v.273, n.1, p.54-65. 2005.

GARNER, W.W.; ALLARD, H.A. Photoperiodism, the response of the plant to relative length of day and night. **Science**, New York, v.55, n.1431, p.582-583, 1920.

GENDALL, A. et al. The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v.107, n.4, p.525-535, 2001.

GRIERSON, C. S. et al. One hundred important questions facing plant science research. **New Phytologist**, Bristol, v.192, n.1, p.6-12, 2011.

GUO, Y. et al. Center of origin and centers of diversity in an ancient crop, Brassica rapa (Turnip Rape). **Journal of Heredity**, Oxford, v.105, n.4, p.555-565, 2014.

GUSTA, L.; WISNIEWSKI, M. Understanding plant cold hardiness: an opinion. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.147, n.1, p.4-14, 2013.

HACKETT, W.P.; HARTMANN, H. The influence of temperature on floral initiation in the olive. **Physiologia Plantarum**, Malden, v.20, n.1, p.430-436, 1967.

HAYAMA, R. et al. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. **Nature**, London, v.422, n.6933, p.719-722, 2003.

HE, Y. et al. The antisense transcriptomes of human cells. **Science**, Washington, v.322, n.5909, p.1855-1857, 2008.

HECHT, V. et al. Conservation of Arabidopsis flowering genes in model legumes. **Plant Physiology**, Glasgow, v.137, n.4, p.1420-1434, 2005.

HEIDE, O.M. Control of flowering and reproduction in temperate grasses. **New Phytologist**, Bristol, v.128, n.1, p.347-362, 1994.

HELLIWELL, C. et al. The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular weight protein complex. **The Plant Journal**, Oxford, v.46, n.2, p.183-192, 2006.

HEMMING, M.N.; TREVASKIS, B. Make hay when the sun shines: The role of MADS-box genes in temperature-dependant seasonal flowering responses. **Plant Science**, Atlanta, v.180, n.3, p.447-453, 2011.

HIGGINS, J.A. et al. Comparative genomics of flowering time pathways using Brachypodium distachyon as a model for the temperate grasses. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 4, p.1-26, 2010.

HOLLAND, J.B. et al. Genomic regions controlling vernalization and photoperiod responses in oat. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v.105, n.1, p.113-126, 2002.

HUANG, T. et al. The mRNA of the Arabidopsis gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. **Science**, Washington, v.309, n.5741, p.1694-1696, 2005.

HUCL, P. Growth response of four hard red spring wheat cultivars to date of seeding. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.75, n.1, p.75-80, 1995.

IQBAL, M. et al. Molecular characterization of vernalization response genes in Canadian spring wheat. **Genome**, Ottawa, v. 50, n. 5, p.511-516, 2007.

IZAWA, T. et al. Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. **Genes & Development**, New York, v.16, n.15, p.2006-2020, 2002.

JANG, S. et al. Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. **EMBO Journal**, Heidelberg, v.27, n.8, p.1277-1288, 2008.

JARILLO, J.A. et al. Review. Photoperiodic control of flowering time. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v.6, n.1, p.221-244, 2008.

JUNG, J. et al. The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v.69, n.4, p.577-588, 2012.

KARDAILSKY, I. et al. Activation tagging of the floral inducer FT. **Science**, Washington, v.286, n.5446, p.1962-1965, 1999.

KAROW R.S. et al. Early growth and development of cereals. **Oregon State University. Serviço de extensão**, Oregon, n.8542, set. 1993.

KIM, D.H. et al. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. **Annual Review of Cell and Developmental**, Palo Alto, v.25, n.1, p.277-299, 2009.

KIM, W.Y. et al. Independent roles for EARLY FLOWERING 3 and ZEITLUPE in the control of circadian timing, hypocotyl length, and flowering time. **Plant Physiology**, Glasgow, v.139, n.3, p.1557-1569, 2005.

KING, R.W.; ZEEVAART, J.A. Floral stimulus movement in perilla and flower inhibition caused by noninduced leaves. **Plant Physiology**, Glasgow, v.51, n.4, p.727-38, 1973.

KIPPES, N. et al. Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene VRN-D4 in hexaploid wheat. **Molecular Genetics & Genomics**, Gothenburg, v.289, n.1, p.47-62, 2014.

LANG, A. Physiology of flower initiation. In: **ENCYCLOPEDIA of Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1965. p.1371-1380.

LEE, H. et al. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. **Genes & development**, New York, v.14 n.18, p.2366-76, 2000.

LEE, J. et al. SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. **The Plant Journal**, Oxford, v.55, n.5, p.832-843, 2008.

LEFORT, F.; DOUGLAS, G.C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. **Annals of Forest Science**, Dordrecht, v.56, n.1, p.259-263, 1999.

LI, C. et al. Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. **The Plant Journal**, Oxford, v.67, n.5, p.763-773, 2011.

LOCATELLI, A.B. et al. Flowering time in oat: Genotype characterization for photoperiod and vernalization response. **Field Crops Research**, Wageningen, v.106, n.3, p.242-247, 2008.

LOCATELLI, A.B. et al. Loci affecting flowering time in oat under short-day conditions. **Genome**, Ottawa, v.49, n.12, p.1528-1538, 2006.

LODHI, M.A. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.12, n.1, p.6-13, 1994.

LÓPEZ, P. et al. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. **Nature**, London, v.410, n.6832, p.1116-1120, 2001.

LOSKUTOV, I. Influence of vernalization and photoperiod to the vegetation period of wild species of oats (*Avena* spp.). **Euphytica**, Wageningen, v.117, n.2, p.125-131, 2001.

LOSKUTOV, I. On evolutionary pathways of *Avena* species. **Genetic Resource and Crop Evolution**, Berlin, v.55, n.2, p.211-220, 2008.

MARIOT, M.P. et al. Herança da estatura de planta e do comprimento da panícula principal no cruzamento entre *Avena sativa* L. e *Avena sterilis* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.1, p.77-82, 1999.

Mc WATTERS, H.G.; DEVLIN, P.F. Timing in plants – A rhythmic arrangement. **FEBS Letters**, Heidelberg, v.585, n.10, p.1474-1484, 2011.

MICHAELS, S.; AMASINO, R. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, n.5, p.949-956, 1999.

MICHAELS, S.D.; AMASINO, R.M. Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. **The Plant Cell**, Rockville, v.13, n.4, p.935–942, 2001.

MICHAELS, S.D.; AMASINO, R.M. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v.23, n.11, p.1145-1153, 2000.

MILEC, Z. et al. Can a late bloomer become an early bird? Tools for flowering time adjustment. **Biotechnology Advances**, Rehovot, v.32, n.1, p.200-214, 2014.

MOON, J. et al. The SOC MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v.35, n.5, p.613-623, 2003.

MORETTIN L.G. Estatística básica: probabilidade e inferência. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010. v.1.

MURPHY, J.P.; HOFFMAN, L. The origin, history and production of oat. In: MARSHALL, H.G.; SORRELS, M.E. (Ed.). **Oat science and technology**, Madison: Crop Science Society of America, 1992. p.1-28.

MUTERKO, A. et al. The new wheat vernalization response allele Vrn-D1s is caused by DNA transposon insertion in the first intron. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.33, n.2, p.294-303, 2015.

NAVA, I.C. **Caracterização genética e molecular de fatores associados a resposta à vernalização para o florescimento em aveia**. 2008. 177 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

NAVA, I.C. et al. Tagging and mapping candidate loci for vernalization and flower initiation in hexaploid oat. **Molecular Breeding**, Lleida, v.30, n.3, p.1295-1312, 2012.

NAVARRO, C. et al. Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. **Nature**, London, v.478, n.7367, p.119-123, 2011.

NEMOTO, Y. et al. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the CONSTANS flowering time gene in transgenic rice. **The Plant Journal**, Oxford, v.36, n.1, p.82-93, 2003.

OLIVER, S.N. et al. Low temperatures induce rapid changes in chromatin state and transcript levels of the cereal VERNALIZATION1 gene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.64, n.8, p.2413–2422, 2013.

OLIVER, S.N. et al. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v.106, n.20, p.8386-8391, 2009.

PAL, N. et al. Development and characterization of microsatellite and RFLP-derived PCR markers in oat. **Crop Science**, Madison, v.42, n.3, p.912-918, 2002.

PIGLIUCCI, M; MARLOW, E. Differentiation for flowering time and phenotypic integration in *Arabidopsis thaliana* in response to season length and vernalization. **Oecologia**, Buenos Aires, v.127, n.4, p.501-508, 2001.

PIN, P. et al. An antagonistic pair of FT homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. **Science**, Washington, v.330, n.6009, p.1397-1400, 2010.

PIN, P. et al. The role of a pseudo-response regulator gene in life cycle adaptation and domestication of beet. **Current Biology**, Cambridge, v.22, n.12, p.1095-1101, 2012.

PRESTON, J.C.; KELLOG, E.A. Conservation and divergence of APETALA1/FRUITFULL-like gene function in grasses: evidence from gene expression analyses. **The Plant Journal**, Oxford, v.52, n.1, p.69-81, 2007.

PUTTERILL, J. et al. The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. **Cell**, Cambridge, v.80, n.6, p.847-857, 1995.

REAM, T.S. et al. Interaction of photoperiod and vernalization determines flowering time of *Brachypodium distachyon*. **Plant Physiology**, Glasgow, v.164, n.2, p.694-709, 2014.

REAM, T.S. et al. The molecular basis of vernalization in different plant groups. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v.77, n.1, p.105-115, 2012.

RINES H.W. et al. Oat. In: KOLE, C. (Eds.). **Genome mapping and molecular breeding in plants**. Berlin:Springer, 2006. v.1, p.211-242.

SALAH, F.A. et al. Genetic identification of a novel bolting locus in *Beta vulgaris* which promotes annuality independently of the bolting gene B. **Molecular Breeding**, Lleida, v.29, n.4, p.989-998, 2012.

SAMPSON, D.R.; BURROWS, V.D. Influence of photoperiod, short-day vernalization and cold vernalization on days to heading in *Avena* species and cultivars. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v.52, n.1, p.471-482, 1972.

SAWA, M. et al. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. **Science**, Washington, v.318, n.5848, p.261-265, 2007.

SCHÖNROCK, N. et al. Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. **Genes & Development**, New York, v.20, n.12, p.1667-1678, 2006.

SEMAGN, K. et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. **Molecular Breeding**, Lleida, v.33, n.1, p.1-14, 2014.

SHCHERBAN, A.B. et al. Identification of a new Vrn-B1 allele using two near-isogenic wheat. **Molecular Breeding**, Lleida, v.29, n.3, p.675-685, 2012.

SHIMADA, S. et al. A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an APETALA1/FRUITFULL-like gene, VRN1, is upstream of FLOWERING LOCUS T. **The Plant Journal**, Oxford, v.58, n.4, p.668-681, 2009.

SOLTIS, D.E. et al. Origin and early evolution of angiosperms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1133, n.1, p.3-25, 2008.

SONG, Y. et al. FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. **Science**, Washington, v.336, n.6084, p.1045-1049, 2012.

SORRELS, M.E.; SIMMONS, S.R. Influence of environment on the development and adaptation of oat. In: MARSHAL, H.G.; SORRELS, M.E. (Eds). **Oat Science and Technology**. Madison: Amer, 1992. p.115-163

SRIKANTH, A.; SCHMID, M. Regulation of flowering time: all roads lead to rome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Freiburg, v.68, n.12, p.2013-2037, 2011.

SUNG, S. et al. A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in Arabidopsis. **Genes & development**, New York, v.20, n.23, p.3244-8, 2006.

SUNG, S.; AMASINO, R. Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. **Nature**, London, v.427, n.6970, p.159-164, 2004.

SWIEZEWSKI, S. et al. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an Arabidopsis Polycomb target. **Nature**, London, v.462, n.7274, p.799-803, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. **Artmed**, Porto Alegre, ed.5, p.918, 2013.

TAKUMI, S. et al. Identification of a large deletion in the first intron of the Vrn-D1 locus, associated with loss of vernalization requirement in wild wheat progenitor Aegilops tauschii cross. **Genes & Genetic Systems**, Otsu, v.86, n.3, p.183-195, 2011.

TEOTIA, S.; TANG, G. To bloom or not to bloom: role of microRNAs in plant flowering. **Molecular Plant**, Shanghai, v.8, n.3, p.359-377, 2015.

TIWARI, S.B. et al. The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. **New Phytologist**, Bristol, v.187, n.1, p.57-66, 2010.

TREVASKIS, B. et al. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v.100, n.22, p.13099-13104, 2003.

TREVASKIS, B. et al. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.12, n. 8, p.352-357, 2007.

TREWARTHA, G.T.; HORN, L.H. **An introduction to climate**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1980.

TURNER, A. et al. The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. **Science**, Washington, v.310, n.5750, p.1031-1034, 2005.

WANG J.W. et al. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. **Cell**, Cambridge, v.138, n.4, p.738-749, 2009a.

WANG, R.H. et al. PEP1 regulates perennial flowering in Arabis alpine. **Nature**, London, v.459, n.7245, p.423-38, 2009b.

WEI, B. et al. Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in Brachypodium distachyon. **PLoS One**, San Francisco, v.9, n.1, p.1-11, 2014.

XUE, W. et al. Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice. **Nature Genetics**, New York, v.40, n.6, p.761-767, 2008.

YAN, L. et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.100, n.11, p.6263-6268, 2003.

YAN, L. et al. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.103, n.51, p.19581-19586, 2006.

YAN, L. et al. The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. **Science**, Washington, v.303, n.5664, p.1640-1644, 2004.

YOSHIDA, T.; NISHIDA, H.; ZHU, J. Vrn-D4 is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.120, n.3, p.543-552, 2010.

ZADOK. Cereal grain development scale. Montana, 2001. Disponível em: http://weeds.montana.edu/crop/Growth_stages_book/p22_23.htm. Acesso em: 10 maio 2013.

ZHENG, B. et al. Quantification of the effects of VRN1 and Ppd-D1 to predict spring wheat (*Triticum aestivum*) heading time across diverse environments. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.64, n.12, p.3747-3761, 2013.