

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

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DE FATORES ASSOCIADOS A
RESPOSTA À VERNALIZAÇÃO PARA O FLORESCIMENTO EM AVEIA

Itamar Cristiano Nava
Engenheiro Agrônomo M.Sc./UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre, (RS), Brasil
Junho de 2008

PÁGINA DE HOMOLOGAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS, em especial ao professor, educador, conselheiro e grande amigo, Luis Carlos Federizzi.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado no Brasil e pela bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

Ao Eastern Cereal and Oilseed Research Centre (ECORC) of Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), na cidade de Ottawa, pela excelente oportunidade de desenvolver o Doutorado Sanduíche nesta instituição, em especial ao Dr. Nicholas Tinker e Charlene Wight, pela contribuição científica à este trabalho e pela grande amizade.

Aos meus pais José Nava e Neizinha da Soler Nava (*in memoriam*) pelos ensinamentos de vida, honestidade, humildade e amor.

Aos meus irmãos queridos que acreditam e torcem por mim a cada dia, em especial ao Beto e a Sale, pelo constante apoio, incentivo e coragem para seguir sempre em frente.

To my Canadian friends and colleagues; Ahmed Badiss, Aleksandra Spasojevic, Annick Gauthier, Anissa Lybaert, Doris Luckert, Dorothy Sibbit, Eglantine Imbeault, He Shan, Hélène Pouzet, Iris Young, Ji-Rui Wang, Jorge Fedak,

Julie Chapados, Nathalie Lanoie, Steve Molnar, Vern Burrows, Weikay Yan...Thank you very much guys!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, em especial ao Adriano Alves da Silva, Adriano de Bernardi Schneider, Ana Beatriz Locatelli, Anderson Luis Nunes, Carlos Alberto Lazaroto, Carol Cover, Clauber Mateus Priebe Bervald, Divanilde Guerra, Emerson Limberger, Everton Allen Brenner, Fabiane Pinto Lamego, Fausto Borges Ferreira, Franceli Rodrigues Kulcheski, Ismael Tiago de Lima Duarte, Josana de Abreu Rodrigues, Laize Fraga Espíndula, Mércio Luiz Strieder, Naracelis Poletto, Noryam Bervian Bispo, Paula Wieltholter, Rodrigo Sampaio dos Santos e Tatiana de Freitas Terra.

À **Deus** pelo dom da vida, saúde e proteção.

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DE FATORES ASSOCIADOS A RESPOSTA À VERNALIZAÇÃO PARA O FLORESCIMENTO EM AVEIA¹

Autor: Itamar Cristiano Nava

Orientador: Luiz Carlos Federizzi

RESUMO

O florescimento é um fator decisivo à adaptação da aveia em ambientes subtropicais. A iniciação floral em alguns genótipos cultivados no Sul do Brasil é dependente de baixas temperaturas, um processo denominado vernalização. Os objetivos deste trabalho foram determinar o número de genes que controlam o caráter resposta à vernalização em aveia, clonar e caracterizar genes associados à vernalização com base na ortologia com outras espécies de gramíneas e identificar marcadores moleculares ligados a estes genes em aveia. O número de genes controlando o caráter resposta à vernalização foi estimado em linhagens recombinantes derivadas dos cruzamentos UFRGS 8 x UFRGS 930605 e UFRGS 881971 e Pc68/5*Starter. A resposta à vernalização nas populações avaliadas foi controlada por dois genes dominantes maiores, onde genótipos insensíveis à vernalização carregam os alelos *AABB*, *AA bb* e *aaBB*, enquanto que genótipos sensíveis à vernalização carregam os alelos *aabb*. Vinte e dois pares de primers ancorados em regiões codificantes conservadas dos genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* de trigo, cevada e azevém foram utilizados para amplificar e clonar sequências de aveia. Sequências clonadas correspondendo aos genes alvo foram recuperadas para ambos *VRN1* e *VRN3*. Outras sequências apresentaram similaridade à uma proteína com motivo zinc-finger e domínio CCT, os quais são componentes do gene *VRN2* em trigo e cevada. Sequências de aveia também apresentaram elevada similaridade ao gene *Hd3a*, o qual está envolvido no florescimento em arroz e é ortólogo aos genes *VRN3* de trigo e cevada e ao gene *FT* de *Arabidopsis thaliana*. O gene *VRN3* foi mapeado em três populações de aveia: UFRGS 8 x UFRGS 930605, UFRGS 881971 x Pc68/5*Starter e Kanota x Ogle. Nas três populações, o gene *VRN3* foi mapeado em regiões cromossômicas colineares correspondendo ao grupo de ligação 6 de K x O. Marcadores moleculares DArT ligados a QTLs que afetam a resposta à vernalização em aveia foram detectados através do mapeamento por intervalo simples. Um QTL associado com a resposta à vernalização foi detectado na população UFRGS 8 x UFRGS 930605, o qual explicou 20% da variação fenotípica observada entre as linhagens recombinantes.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (117p.) Junho, 2008.

GENETICS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FACTORS ASSOCIATED TO VERNALIZATION RESPONSE OF FLOWERING TIME IN OAT²

Author: Itamar Cristiano Nava
Adviser: Luiz Carlos Federizzi

ABSTRACT

Flowering time is a decisive factor in the adaptation of oat to sub-tropical environments. Varieties grown in southern Brazil show response to low temperature-dependant floral initiation, a process called vernalization. The objectives of this study were to determine the number of genes controlling the response to vernalization in oats, to clone and characterize genes associated with vernalization based on orthology with other grass species, and to identify molecular markers linked to those genes in oats. The number of genes controlling the response to vernalization was estimated in recombinant inbred lines from the crosses UFRGS 8 x UFRGS 930605 and UFRGS 881971 x Pc68/5*Starter. Response to vernalization in the evaluated populations was controlled by two dominant major genes with the vernalization-insensitive genotypes carrying *AABB*, *AAbb*, and *aaBB* alleles, whereas the vernalization-responsive ones carrying *aabb* alleles. Twenty-two primer pairs anchored in conserved coding regions of *VRN1*, *VRN2*, and *VRN3* genes from wheat, barley, and *Lolium* were used to amplify and clone oat sequences. Cloned sequences corresponding to the targeted genes were recovered for both *VRN1* and *VRN3*. Other sequences showed similarity to a protein with a zinc-finger motif and a CCT domain, which are components of *VRN2* in wheat and barley. Oat sequences also showed high similarity to the *Hd3a* gene, which is involved with flowering time in rice, and is an orthologue of the wheat and barley *VRN3* gene and the *Arabidopsis thaliana FT* gene. The *VRN3* gene was mapped in three oat populations: UFRGS 8 x UFRGS 930605, UFRGS 881971 x Pc68/5*Starter and Kanota x Ogle. In all three populations, *VRN3* fell within colinear regions corresponding to KxO linkage group 6. DArT markers linked to QTLs for response to vernalization in oats were detected by simple interval mapping. One quantitative trait locus (QTL) associated to vernalization response was identified in the UFRGS 8 x UFRGS 930605 population, which explained 20% of the phenotypic variation observed among the recombinant inbred lines.

² Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (117p.) June, 2008.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Aveia: espécie cultivada e alimento	4
2.2. O florescimento em aveia	5
2.3. Fisiologia da vernalização	6
2.4. Bases genéticas da resposta à vernalização em cereais	9
2.5. Bases moleculares da resposta à vernalização em cereais	11
2.6. Bases moleculares da resposta à vernalização em <i>Arabidopsis</i>	14
2.7. Regulação do florescimento em <i>Arabidopsis</i> e cereais	15
2.8. Nível de conservação dos genes de vernalização	17
2.9. Mecanismos epigenéticos de regulação da resposta à vernalização	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Efeito da vernalização sobre o florescimento em aveia	20
3.2. Avaliação do florescimento em linhagens recombinantes de aveia sob condições de campo	21
3.3. Análise genética da resposta à vernalização em linhagens recombinantes de aveia	23
3.4. Clonagem de genes associados à vernalização em aveia	26
3.4.1. Material genético	26
3.4.2. Identificação de genes de vernalização ortólogos em gramíneas	26
3.4.3. Alinhamento múltiplo de sequências	27
3.4.4. Desenvolvimento de primers	28
3.4.5. Reações de amplificação	28
3.4.6. Purificação de DNA, clonagem e sequenciamento	29
3.4.7. Análise de sequências codificantes de aveia	32
3.5. Análise de arranjos de diversidade – DArT.....	33
3.5.1. Material vegetal	33
3.5.2. Extração de DNA genômico	34
3.5.3. Purificação do DNA genômico	35
3.5.4. Concentração e submissão do DNA para análise de DArT	36
3.5.5. Preparo de representações genômicas	36
3.5.6. Desenvolvimento de bibliotecas genômicas	37
3.5.7. Preparo dos microarranjos de DNA	37
3.5.8. Genotipagem do DNA das linhagens recombinantes de aveia	38

3.5.9. Análise de imagens e identificação de polimorfismos	38
3.5.10. Construção dos mapas genéticos de ligação	39
3.6. Mapeamento molecular do gene <i>VRN3</i> em aveia	40
3.6.1. Populações de mapeamento	40
3.6.2. Primer polimórfico e reações de amplificação	40
3.6.3. Análise de polimorfismos	41
3.6.4. Localização genômica do gene <i>VRN3</i> e mapeamento comparativo ..	42
3.6.5. Associação entre polimorfismos moleculares do gene <i>VRN3</i> e resposta à vernalização em aveia.	42
3.7. Mapeamento de QTLs associados com o florescimento e resposta à vernalização em aveia	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. Efeito da vernalização sobre o florescimento em aveia	46
4.2. Avaliação do florescimento em linhagens recombinantes de aveia sob condições de campo	50
4.3. Análise genética da resposta à vernalização em linhagens recombinantes recombinantes de aveia.....	57
4.4. Clonagem de genes associados à vernalização em aveia	65
4.5. Análise de arranjos de diversidade – DArT	78
4.6. Mapeamento molecular do gene <i>VRN3</i> em aveia	87
4.7. Mapeamento de QTLs associados com o florescimento e resposta à vernalização em aveia	95
5. DISCUSSÃO GERAL	102
6. CONCLUSÕES	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
8. APÊNDICE	115

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Análise de variância para a variável número de dias da semeadura ao florescimento (NDF). EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS. 2005.....	46
2. Florescimento médio e comparação de médias para genótipos de aveia avaliados em diferentes tratamentos de vernalização. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS. 2005	47
3. Teste de ajustamento do qui-quadrado (χ^2) das proporções observadas e esperadas para o modelo de dois genes (3:1) controlando a resposta à vernalização na população U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa, 2007	62
4. Teste de ajustamento do qui-quadrado (χ^2) das proporções observadas e esperadas para o modelo de dois genes (3:1) controlando a resposta à vernalização na população U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa, 2007	62
5. Sequência, orientação e número de bases dos primers que amplificaram sequências em aveia associadas aos genes <i>VRN1</i> , <i>VRN2</i> e <i>VRN3</i> . AAFC-CEF, Ottawa. 2007	68
6. Coeficientes de correlação entre polimorfismos moleculares do gene <i>VRN3</i> e as variáveis determinadas no experimento de vernalização; tratamento vernalizado (VERN), tratamento não-vernalizado (NVERN) e resposta à vernalização (RVERN), para as populações de aveia U8 x U605 e U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa. 2007	93
7. Resumo da análise de QTLs afetando o número de dias ao florescimento e resposta à vernalização, para a população de aveia U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.....	97
8. Resumo da análise de QTLs afetando o número de dias ao florescimento e resposta à vernalização, para a população de aveia U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.....	99

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Comparação das rotas moleculares regulando florescimento em <i>Arabidopsis thaliana</i> e cereais temperados. Modelo modificado a partir de Trevaskis et al., 2007	16
2. Número de dias ao florescimento (NDF) em resposta ao tratamento de vernalização. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS. 2005	49
3. Distribuição do número de dias da emergência ao florescimento para linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre U8 x U605 avaliadas em duas épocas de semeadura. AAFC-CEF, Ottawa. 2007	51
4. Distribuição do número de dias da emergência ao florescimento para linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre U71 x Pc68 avaliadas em duas épocas de semeadura. AAFC-CEF, Ottawa. 2007	52
5. Distribuição da resposta à semeadura do cedo em linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa, 2007	53
6. Distribuição da resposta à semeadura do cedo em linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa, 2007	53
7. Distribuição do número de dias ao florescimento para linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U8 x U605 avaliadas nos tratamentos vernalizado (VERN) e não-vernalizado (NVERN). AAFC-CEF, Ottawa. 2007	57
8. Distribuição do número de dias ao florescimento para linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U71 x Pc68 avaliadas nos tratamentos vernalizado (VERN) e não-vernalizado (NVERN). AAFC-CEF, Ottawa. 2007	58
9. Distribuição da resposta à vernalização em linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa. 2007	59
10. Distribuição da resposta à vernalização em linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa. 2007	60

11. Diagrama da sequência consenso para os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3*. Barras pretas representam éxons e caixas brancas representam íntrons. O número de nucleotídeos (pares de bases) de cada éxon e íntron é apresentado dentro de barras e caixas. A localização de ancoragem dos pares de primers que geraram sequências de aveia associadas aos genes de vernalização está apresentada abaixo da sequência consenso de cada gene em caixas pontilhadas. AAFC-CEF, Ottawa. 2007 67
12. Alinhamento de duas sequências (aveia e trigo) para o gene *VRN1*. A sequência de aveia foi representada pelo genótipo U8 e a sequência de trigo pelo cultivar Triple Dirk D (AY747601). Sequências nucleotídicas em negrito correspondem regiões codificantes (éxons) conservadas em aveia e trigo. AAFC-CEF, Ottawa. 2007 71
13. Comparação do tamanho de éxons e íntrons do gene *VRN1* em trigo e aveia. Regiões isoladas e não isoladas do gene *VRN1* em aveia foram destacadas em caixas pontilhadas. AAFC-CEF, Ottawa 72
14. Alinhamentos parciais de regiões genômicas conservadas do gene *VRN1* em aveia. Identidade molecular à sequência padrão (U8) é representada por ponto e ausência de alinhamento entre nucleotídeos é representada por hífen. A) região conservada do terceiro éxon; B) região conservada do quarto éxon; C) região conservada do quinto éxon e; D) região conservada do sexto éxon. AAFC-CEF, Ottawa. 2007 73
15. Alinhamento de sequências mostrando região conservada do gene *VRN2*. A) alinhamento de sequências do genitor U8 e trigo (acesso AY485964); B) alinhamento de sequências dos genitores U8 e U605. AAFC-CEF, Ottawa. 2007 75
16. Alinhamentos parciais de regiões genômicas conservadas do gene *VRN3* em aveia. Identidade molecular à sequência padrão (U8) é representada por ponto e ausência de alinhamento entre nucleotídeos representada por hífen. AAFC-CEF, Ottawa. 2007 77
17. Mapa genético de ligação baseado em marcadores moleculares DArT para o cruzamento de aveia entre os genitores U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa. 2007 80
18. Mapa genético de ligação baseado em marcadores moleculares DArT para o cruzamento de aveia entre os genitores U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa. 2007 83
19. Polimorfismos moleculares observados para os genitores U71 e Pc68 e oito linhagens recombinantes derivadas deste cruzamento. Os polimorfismos foram gerados pelo primer Ver3-23. As bandas polimórficas localizadas na

porção inferior do gel de agarose e destacadas dentro da caixa retangular foram analisadas e empregadas para o mapeamento do gene <i>VRN3</i> em aveia. AAFC-CEF, Ottawa. 2007	88
20. Mapeamento molecular do gene <i>VRN3</i> em aveia. O gene <i>VRN3</i> foi mapeado nos grupos de ligação 11, 9 e 7 das populações U8 x U605, U71 x Pc68 e K x O, respectivamente, usando marcadores moleculares DArT. O mapa de ligação comparativo demonstra que o gene <i>VRN3</i> está localizado em regiões colineares entre as diferentes populações analisadas. AAFC-CEF, Ottawa. 2007	90

1 INTRODUÇÃO

A aveia cultivada (*Avena sativa* L.) é um cereal de excelente valor nutritivo, podendo ser empregada tanto na alimentação humana quanto animal. Dentre os cereais disponíveis à dieta humana, a aveia destaca-se pela constituição e qualidade de suas proteínas e pelo elevado conteúdo de fibras solúveis, o que auxilia na redução dos níveis de colesterol no sangue.

A aveia é uma cultura recente do ponto de vista de exploração agrícola e de melhoramento genético no Brasil, quando comparada ao trigo e cevada. Porém, a aveia contribui de maneira eficiente para a redução dos custos de produção e, para a maior sustentabilidade e qualidade dos sistemas agrícolas.

Na região Sul do Brasil, culturas de verão como soja e milho assumem um papel principal na cadeia produtiva. No entanto, o cultivo de inverno não deve ser considerado menos importante, uma vez que este integra o sistema de rotação e sucessão de culturas, gera renda ao produtor e permite o estabelecimento e manutenção do sistema de plantio direto.

O número de dias da semeadura ao florescimento e a colheita é um fator decisivo para o sucesso e estabelecimento da aveia como espécie cultivada. A ocorrência do florescimento em um momento favorável dentro da estação de crescimento, representa um dos principais fatores de adaptação de diferentes

cultivares a diferentes ambientes de cultivo e, conseqüentemente, na determinação do potencial de rendimento de grãos.

O florescimento em aveia é influenciado em grande parte pela interação entre efeitos de fotoperíodo, vernalização e soma térmica. O requerimento à vernalização é um processo evolutivo e tem a função de atrasar o desenvolvimento reprodutivo, até que o risco de dano por frio às inflorescências jovens tenha sido minimizado.

A iniciação floral em alguns genótipos brasileiros de aveia é dependente de baixas temperaturas na fase inicial de desenvolvimento das plantas, um processo denominado vernalização. Entretanto, os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos no controle da resposta à vernalização em aveia ainda não foram elucidados. O entendimento destes mecanismos contribuirá para o desenvolvimento de cultivares de aveia com diferentes requerimentos ao florescimento, maior nível de adaptação e exploração agrícola em áreas até então consideradas inadequadas para cultivo.

A fim de promover o entendimento de fatores envolvidos no florescimento em aveia, uma série de estudos genéticos e moleculares foram desenvolvidos a partir das seguintes hipóteses científicas:

- as condições climáticas do Sul do Brasil, com ocorrência de baixas temperaturas durante o inverno, permitem a manutenção de genes de vernalização no germoplasma de aveia. São esperadas diferenças na resposta à vernalização entre os diferentes genótipos de aveia;
- a presença e ausência de resposta à vernalização em linhagens recombinantes derivadas do cruzamento entre genitores contrastantes, permite determinar a herança genética do caráter resposta à vernalização em aveia. Estudos genéticos realizados em trigo, cevada e centeio indicam que a resposta à vernalização

apresenta herança genética simples, governada por poucos genes de grande efeito e completamente herdáveis. Por homologia, é esperado que o controle genético da resposta à vernalização em aveia seja similar ao do trigo, cevada e centeio;

- os mecanismos de indução ao florescimento em resposta à vernalização, estudados em espécies de gramíneas como trigo e cevada, englobam a conservação dos principais genes envolvidos nas rotas metabólicas em resposta à vernalização. É esperado que em aveia, genes de vernalização ortólogos aos genes de trigo e cevada estejam presentes. A ortologia ou similaridade molecular dos genes de vernalização em cereais possibilita a clonagem e sequenciamento de genes associados à vernalização em aveia. Além disso, marcadores moleculares ligados aos genes de vernalização podem ser identificados, os quais serão úteis para os programas de melhoramento genético de aveia, especialmente na seleção de genes de vernalização assistida por marcadores moleculares.

Desta forma, os principais objetivos deste trabalho foram:

- i) caracterizar fenotipicamente genótipos brasileiros de aveia quanto ao número de dias ao florescimento e resposta a diferentes tratamentos de vernalização;
- ii) determinar o número de genes envolvidos na resposta à vernalização em aveia;
- iii) clonar e caracterizar sequências de aveia associadas a genes de vernalização, com base na ortologia existente entre espécies de gramíneas;
- iv) desenvolver mapas genéticos de ligação em populações brasileiras de aveia, a partir de polimorfismos moleculares derivados da tecnologia de arranjos de diversidade (DArT);
- v) mapear genes de vernalização em aveia usando primers específicos aos genes;
- vi) identificar marcadores moleculares ligados a QTLs que afetam a resposta à vernalização em aveia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aveia: espécie cultivada e alimento

A aveia é um cereal da família Poaceae com provável centro de origem no Oriente Médio. A maior distribuição e cultivo estão concentrados em áreas de clima temperado e úmido na América do Norte e Europa (Murphy & Hoffman, 1992). Na América Latina, o Brasil é um dos maiores produtores de aveia para grãos, sendo sua introdução atribuída aos imigrantes espanhóis (Federizzi, 2002).

A aveia cultivada (*Avena sativa* L.) é uma espécie hexaplóide $2n = 6x = 42$ cromossomos, originada a partir da agregação de três genomas ancestrais diplóides (AA, CC, DD). A aveia apresenta um genoma extenso e complexo, similar ao genoma do trigo. O genoma haplóide de aveia possui cerca de 11.315 Mb (Arumuganathan & Earle, 1991), o qual é cerca de 100 vezes maior ao genoma de *Arabidopsis thaliana*. O sistema de reprodução da aveia é por autofecundação.

A aveia destaca-se pelo seu excelente valor nutritivo, podendo ser empregada na alimentação humana e animal. A aveia apresenta a maior concentração de proteínas entre os cereais, com teor de 12 a 20% em grãos descascados e nove a 15% em grãos inteiros (Peterson, 1992). O perfil de aminoácidos em aveia é superior ao do trigo, cevada e milho, para todos os aminoácidos essenciais. A concentração de óleo em cultivares de aveia pode variar de quatro a 11% e sua composição apresenta alta proporção de ácidos graxos

insaturados, o que o torna adequado para consumo humano (Peterson, 1992). Além disso, a aveia apresenta elevado conteúdo de fibras solúveis “beta-glicanas”, as quais apresentam efeito positivo na redução dos níveis de colesterol do sangue, diminuição dos riscos de doenças cardíacas e controle do diabetes tipo II (Peterson, 2004).

2.2 O florescimento em aveia

A indução ao florescimento em aveia é influenciado em grande parte pelos efeitos de fotoperíodo, vernalização e soma térmica. A aveia (*Avena sativa* L.) é uma planta de dia longo, onde períodos longos de luz alternados com períodos curtos de escuro promovem o florescimento na maioria dos genótipos (Sorrells & Simmons, 1992). Entretanto, genótipos de aveia apresentam ampla variação natural quanto à resposta ao fotoperíodo. Em geral, cultivares oriundos de altas latitudes apresentam maior sensibilidade ao fotoperíodo em relação a cultivares oriundos de baixas latitudes (Sorrells & Simmons, 1992).

A iniciação floral em alguns genótipos de aveia também é dependente de baixas temperaturas, um processo denominado vernalização. A “vernalização” pode ser definida como a aquisição ou aceleração da habilidade de florescimento após a exposição natural ou artificial de plantas jovens ao frio (Chouard, 1960). Variação genética e/ou resposta quantitativa à vernalização estão presentes entre diferentes genótipos de aveia.

Além das respostas de fotoperíodo e vernalização, a passagem da fase vegetativa para a fase reprodutiva em aveia também é influenciada pelos efeitos de temperatura e/ou soma térmica. De maneira geral, o florescimento em aveia ocorre em resposta a interações entre fotoperíodo, vernalização e soma térmica, sendo

que o efeito de cada fator ambiental varia de genótipo para genótipo. Por exemplo, a vernalização pode reduzir a sensibilidade ao fotoperíodo em alguns genótipos de aveia (Sorrells & Simmons, 1992). Esta resposta foi demonstrada em 21 espécies de aveia silvestre, onde a exigência de frio teve maior importância do que o fotoperíodo na indução do florescimento (Loskutov, 2001). O mesmo processo foi observado em trigo e cevada de inverno, onde o fator decisivo ao florescimento foi à saturação de vernalização, independente do fotoperíodo (Mahfoozi *et al.*, 2001).

Resposta à vernalização foi detectada em genótipos de aveia cultivados na região Sul do Brasil (Nava *et al.*, 2006; Locatelli *et al.*, 2008). Dentre os genótipos que responderam positivamente ao tratamento de vernalização destacaram-se UFRGS 881971 e UFRGS 930605. O florescimento nestes genótipos foi antecipado em mais de 15 dias em comparação ao tratamento não-vernalizado.

A variação genética natural da resposta à vernalização observada no germoplasma brasileiro de aveia, cria inúmeras possibilidades ao melhoramento genético. Essa variação permite que cultivares com resposta à vernalização sejam desenvolvidos para ambientes mais frios, como na região Sul do Brasil. Nestas condições, o ciclo vegetativo pode ser prolongado, com aumento no potencial de rendimento de grãos devido à maior biomassa produzida e sem comprometer a safra de verão. Por outro lado, a seleção de cultivares que não apresentam resposta à vernalização permite o seu cultivo em áreas com temperaturas mais elevadas e com uma estação de crescimento vegetativo mais restrita.

2.3 Fisiologia da vernalização

A vernalização promove o florescimento após um tratamento de frio fornecido à uma semente hidratada ou à uma planta em crescimento (Sung & Amasino,

2004). Plantas que necessitam de frio para promover o florescimento incluem espécies perenes, bienais ou anuais de inverno. Estas espécies variam quanto à idade na qual respondem à vernalização. Genótipos anuais de inverno, como trigo, cevada e aveia respondem muito cedo, podendo ser vernalizadas antes da germinação, desde que as sementes sejam previamente embebidas em água e tornem-se metabolicamente ativas (Henderson *et al.*, 2003).

A faixa de temperatura efetiva para que a vernalização ocorra varia de 0,5 a 10°C, com uma faixa ótima entre 1 e 5°C (Ritchie, 1993). O efeito da vernalização aumenta com a duração do tratamento de frio até que a resposta seja saturada, demonstrando a natureza quantitativa da resposta à vernalização (Lang, 1965). A resposta geralmente requer várias semanas de exposição ao frio, mas a duração precisa varia entre e dentro de uma mesma espécie. A vernalização pode ser perdida como resultado da exposição a altas temperaturas, porém, quanto maior for a exposição ao frio, mais permanente será o seu efeito (Lang, 1965).

Em muitas espécies, a vernalização *per se* não é suficiente para induzir ao florescimento, apenas resultando na competência para o florescimento. Isto foi ilustrado pelo experimento clássico com a espécie bienal *Hyoscyamus niger*, a qual apresenta um requerimento obrigatório de vernalização, seguido pela indução ao florescimento por dias longos (Lang & Melchers, 1965). Plantas de *Hyoscyamus niger* vernalizadas mantidas em condições de dia curto não atingiram o florescimento. Por outro lado, plantas vernalizadas mantidas em uma condição indutiva de fotoperíodo (dias longos) floresceram precocemente.

Estudos envolvendo tratamento localizado de frio e enxertia (*grafting*) demonstraram que o meristema apical é o sítio de percepção durante a vernalização. Em muitas espécies, a vernalização é uma resposta localizada e não

é transmitida para outras plantas não-vernalizadas através de enxertia. Por outro lado, existem situações onde o florescimento de uma planta não-vernalizada é promovido pela enxertia de tecidos a partir de uma planta vernalizada. Este processo de transmissão foi demonstrado em ervilha (*Pisum sativum*) e *Hyoscyamus niger* (Lang & Melchers, 1965).

Outro estudo que identificou o sítio de percepção pelo frio durante a vernalização e demonstrou o efeito da memória celular após a vernalização envolveu a regeneração 'in vitro' de plantas de *Lunaria biennis* (Wellensiek, 1964). Plantas de *Lunaria biennis* regeneradas a partir de folhas maduras de plantas vernalizadas atuaram como se elas não tivessem recebido o tratamento de frio. Apenas tecidos que continham células em divisão, incluindo meristemas caulinares e folhas jovens, regeneravam plantas vernalizadas.

Inúmeros modelos de ação da vernalização sobre o florescimento em plantas superiores foram propostos nos últimos anos. Entre eles, o modelo de regulação epigenética parece ser o mais provável. A partir deste modelo, mudanças estáveis no padrão de expressão gênica ocorrem no meristema após o tratamento de frio e promovem a competência das plantas ao florescimento. A mudança da expressão gênica mantém-se estável através de sucessivas divisões celulares (mitose), após o sinal indutor (frio) ter sido removido. Esta memória é perdida na meiose e, portanto, não é transmitida para a geração seguinte. A perda da memória celular garante que o requerimento à vernalização seja readquirido a cada geração e que o florescimento não ocorrerá em condições adversas (Henderson *et al.*, 2003). Maiores detalhes de como a vernalização regula o florescimento será abordado e discutido ao longo deste trabalho.

2.4 Bases genéticas da resposta à vernalização em cereais

As respostas de vernalização e fotoperíodo estão sujeitas à variação genética. Esta variação natural é empregada pelos programas de melhoramento genético para produzir dois tipos principais de cultivares, denominados de inverno e primavera. Cultivares de inverno apresentam requerimento obrigatório à vernalização e são tipicamente sensíveis ao fotoperíodo de dias longos. Cultivares de primavera apresentam menor resposta à vernalização e sensibilidade ao comprimento do dia em comparação aos cultivares de inverno. Essas diferenças no padrão de florescimento são importantes na adaptação de espécies de cereais como trigo, cevada e aveia para diferentes regiões agrícolas do mundo (Iwaki *et al.*, 2001).

A vernalização promove a passagem do desenvolvimento vegetativo para o desenvolvimento reprodutivo. Esta transição é controlada por genes que impedem o desenvolvimento da flor durante condições de baixas temperaturas e fornecem proteção aos órgãos florais sensíveis ao frio. Análises genéticas em trigo e cevada identificaram três genes centrais controlando processos metabólicos importantes na rota de resposta à vernalização. Estes genes foram denominados *VRN1*, *VRN2* e *VRN3*, os quais foram recentemente clonados e demonstram efeito regulatório não apenas na resposta à vernalização, mas também na promoção do florescimento em condições de fotoperíodo de dias longos (Trevaskis *et al.*, 2007).

A vernalização acelera o início da formação de inflorescências pela indução do gene *VRN1*, o qual é um promotor natural do florescimento em trigo, cevada e em outras espécies de gramíneas (Trevaskis *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). O gene *VRN1* foi mapeado em regiões colineares no braço longo dos cromossomos 5A, 5B e 5D do trigo e no cromossomo 5H de cevada (Barret *et al.*, 2002; Iwaki *et al.*, 2002;

Yan *et al.*, 2003). Variação alélica para o gene *VRN1* em trigo pode estar associada com mutações na região promotora ou no primeiro íntron do gene (Fu *et al.*, 2005).

Ao contrário do gene *VRN1*, o qual promove o florescimento em espécies de gramíneas, o gene *VRN2* reprime o florescimento até que as plantas tenham sido vernalizadas (Dubcovsky *et al.*, 1998; Karsai *et al.*, 2005). Este gene foi mapeado no cromossomo 5A do trigo e no cromossomo 4H de cevada (Dubcovsky *et al.*, 1998; Laurie *et al.*, 1995).

Alelos dominantes do gene *VRN1* em trigo e cevada conferem fenótipo com hábito de crescimento de primavera. Por outro lado, alelos dominantes para o gene *VRN2* produzem um fenótipo com hábito de crescimento de inverno (Yan *et al.*, 2004b). A localização genômica similar e interações epistáticas dos genes *VRN1* e *VRN2*, sugerem que estes genes estão conservados e, portanto, são ortólogos em trigo e cevada (Laurie *et al.*, 1995; Dubcovsky *et al.*, 1998).

O gene *VRN3* acelera o desenvolvimento do ápice reprodutivo em trigo e cevada (Faure *et al.*, 2007). *VRN3* integra tanto resposta à vernalização, como resposta ao fotoperíodo de dias longos. A expressão do gene *VRN3* a exemplo do que ocorre com o gene *VRN1*, é reprimida por *VRN2* em genótipos que apresentam requerimento obrigatório à vernalização. Assim, a exposição de plantas a baixas temperaturas seguida por fotoperíodo indutivo de dias longos induz à expressão do gene *VRN3* e, conseqüentemente, promove o florescimento (Yan *et al.*, 2006). O gene *VRN3* contribui para a variação alélica natural observada entre genótipos com requerimento à vernalização e, fornece fontes adicionais de diversidade adaptativa para espécies de grande importância econômica como trigo e cevada.

O gene *VRN3* está localizado no braço curto do cromossomo 7B em trigo e no braço curto do cromossomo 7H em cevada (Yan *et al.*, 2006). Alelos dominantes

do gene *VRN3* promovem florescimento precoce em trigo e cevada. Em trigo, alelos dominantes do gene *VRN3* estão associados à inserção de um retroelemento na região promotora do gene, enquanto que em cevada, mutações no primeiro íntron do gene diferenciam plantas com alelos dominantes e recessivos para o gene *VRN3* (Yan *et al.*, 2006).

Embora, um grande número de genótipos brasileiros de aveia apresente resposta à vernalização, o controle genético desta resposta não é conhecido. No entanto, o elevado nível de similaridade molecular entre os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* identificado em trigo e cevada, indicam que estes genes podem estar também conservados em outras espécies de cereais, como aveia. A clonagem dos genes de vernalização em trigo, cevada e outras espécies de gramíneas, somada à existência de ortologia destes genes nestas espécies, contribuirão para o entendimento dos principais mecanismos genéticos e moleculares da resposta à vernalização em aveia.

2.5 Bases moleculares da resposta à vernalização em cereais

O isolamento e caracterização dos genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* em trigo e cevada proporcionaram um grande avanço no entendimento da natureza genética e molecular da resposta à vernalização e como as baixas temperaturas afetam o florescimento em genótipos com requerimento à vernalização.

O gene *VRN1* codifica um fator de transcrição do tipo MADS box, similar ao gene *APETALA1* (*AP1*) de *Arabidopsis thaliana* (Yan *et al.*, 2003). MADS box é uma classe de proteínas que regula o desenvolvimento de órgãos florais e de identidade do meristema apical em um grande número de espécies vegetais (Preston & Kellogg 2006). Além disso, proteínas com domínio MADS desempenham

papéis regulatórios no tempo de florescimento (Borner *et al.*, 2000; Michaels *et al.*, 2003), crescimento lateral de raízes (Zhang & Forde, 1998), desenvolvimento de frutos (Ferrándiz *et al.*, 2000) e desenvolvimento do óvulo (Pinyopich *et al.*, 2003).

Em genótipos com requerimento à vernalização, o gene *VRN1* é inicialmente expresso em baixos níveis, sendo significativamente induzido pela vernalização (Murai *et al.*, 2003; Trevaskis *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). Em genótipos que não requerem vernalização, a expressão do gene *VRN1* aumenta durante o início de formação de inflorescências e permanece elevado em estágios subsequentes do desenvolvimento apical (Trevaskis *et al.*, 2007). Isto sugere que o gene *VRN1* desempenha um papel importante na regulação do meristema de identidade floral, o qual não é limitado pelo requerimento à vernalização.

O gene *VRN2* codifica uma família de proteínas com motivo *zinc-finger* e domínio CCT. Duas classes principais de proteínas são codificadas pelo gene *VRN2*; *ZCCT1* e *ZCCT2*, as quais podem mediar ligações de DNA (Yan *et al.*, 2004b). A expressão do gene *VRN2* ocorre em presença de luz em condições de fotoperíodo de dias longos (Dubcovsky *et al.*, 2006; Trevaskis *et al.*, 2006).

Mutações de perda de função e silenciamento do gene *VRN2* em plantas transgênicas através de RNA de interferência (RNAi) reduziram o nível de transcrição deste gene e, conseqüentemente, reduziram o número de dias ao florescimento (Yan *et al.*, 2004b). Plantas com expressão reduzida do gene *VRN2* apresentaram níveis aumentados de expressão do gene *VRN1* (Yan *et al.*, 2004b). Com base nestas observações, o modelo de dois genes para a rota de resposta à vernalização foi proposto. *VRN2* atua atrasando o florescimento antes da vernalização pela repressão de *VRN1*, porém, a vernalização reprime *VRN2* e induz a expressão de *VRN1*, o qual promove o florescimento (Yan *et al.*, 2004b). Este

modelo é consistente com dados genéticos que demonstraram interações epistáticas entre os genes *VRN1* e *VRN2* e que estes genes possivelmente fazem parte de uma mesma rota regulatória (Tranquilli & Dubcovsky, 2000).

O gene *VRN3* codifica uma proteína de ligação do tipo polietanolamina (PEBP) (Yan *et al.*, 2006). Esta classe de proteína está envolvida na sinalização celular em diversos organismos (Yeung *et al.*, 1999; Krosiak *et al.*, 2001). A superexpressão do gene *VRN3* em plantas transgênicas de diversas espécies está associada ao florescimento precoce (Kobayashi *et al.*, 1999; Bohlenius *et al.*, 2006), sugerindo sua ação promotora do florescimento. A indução do gene *VRN3* nas folhas resulta em um sinal transmissível que viaja através do floema até o ápice, onde induz o florescimento (Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005). Estudos também sugerem que o RNA mensageiro do gene *VRN3* é capaz de se mover das folhas, local onde o fotoperíodo é percebido, até o ápice (Huang *et al.*, 2005).

Em cevada, a indução do gene *VRN3* em condições de dias longos requer um segundo gene, *PHOTOPERIOD1 (PPD-H1)* (Turner *et al.*, 2005). Por outro lado, a expressão de *VRN3* é reprimida pelo gene *VRN2* sob fotoperíodo de dias longos. Isto pode ocorrer através da interação direta entre a proteína codificada pelo gene *VRN2* e a sequência gênica de *VRN3*, ou indiretamente através de interações com outros componentes da rota do fotoperíodo, tal como *PPD-H1* (Trevaskis *et al.*, 2007). Assim, interações regulatórias dos genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* integram ambas respostas de vernalização e fotoperíodo.

QTLs para resposta à vernalização foram mapeados na espécie gramínea *Lolium perenne* L. (Jensen *et al.*, 2005). A população de mapeamento (F₂) foi derivada a partir de genótipos com diferentes exigências à vernalização. Cinco QTLs foram identificados e mapeados nos grupos de ligação 2, 4, 6 e 7. O QTL de

maior efeito explicou 28% da variação fenotípica para a resposta à vernalização e foi identificado no grupo de ligação 4. Este QTL também está co-localizado com um marcador CAPS (*Cleaved, Amplified Polimorphisms*) derivado de avevém com possível ortologia ao gene *VRN1* de trigo (Jensen *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 2006).

Em aveia, muito pouco é conhecido sobre os fatores envolvidos com a resposta à vernalização. Entretanto, QTLs controlando florescimento precoce e resposta à vernalização foram identificados nas populações Kanota x Ogle (K x O) e Ogle x TAM0-301 (Holland *et al.*, 1997; Portyanko, 2001; Holland *et al.*, 2002; Wight *et al.*, 2003). Na população K x O, um loco individual explicou 37% da variação fenotípica observada para plantas não-vernalizadas e 29% da variação fenotípica para a resposta à vernalização (Holland *et al.*, 1997).

Recentemente, QTLs controlando número de dias ao florescimento foram identificados em três populações brasileiras de aveia (Locatelli *et al.*, 2006). O mapeamento comparativo entre as populações brasileiras e K x O demonstrou que o QTL que apresentou o maior efeito sobre o florescimento está localizado em uma região homóloga ao grupo de ligação 17 e associado ao gene *Di1*, o qual confere insensibilidade ao fotoperíodo (Burrows, 1986). Além disso, este QTL apresentou homologia aos genes *Hd1* do arroz e *CONSTANS (CO)* de *Arabidopsis*, os quais são promotores do florescimento e integram rotas metabólicas em resposta ao fotoperíodo.

2.6 Bases moleculares da resposta à vernalização em *Arabidopsis*

A vernalização promove o florescimento precoce em muitos ecótipos de *Arabidopsis*. O regulador central do florescimento induzido pela vernalização em

Arabidopsis é o gene *Flowering Locus C (FLC)* (Michaels & Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999). O gene *FLC* é um repressor floral que atrasa o desenvolvimento do ápice reprodutivo e a promoção do florescimento por dias longos (Michaels & Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999). O gene *FRIGIDA (FRI)* eleva a expressão de *FLC* para níveis que inibem o florescimento, enquanto que a vernalização promove a inibição do gene *FLC* e induz o florescimento (Michaels & Amasino, 1999; Johanson *et al.*, 2000).

O gene *FLC* inibe a transcrição de dois genes promotores do florescimento; *Flowering Locus T (FT)* e *Supressor of Over-expression of Constans 1 (SOC1)* (Lee *et al.*, 2000; Michaels *et al.*, 2005). Em plantas não-vernalizadas, *FLC* é expresso em altos níveis e sua proteína liga-se a regiões intrônicas do gene *FT* e a região promotora do gene *SOC1* para reprimir a transcrição de ambos os genes (Helliwell *et al.*, 2006).

A vernalização inibe a transcrição do gene *FLC* (Michaels & Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999) e isto permite a expressão do gene *FT* em condições de dias longos, o qual promove a transição para o desenvolvimento reprodutivo. O grau com que o gene *FLC* é reprimido depende da duração de exposição das plantas ao frio, permitindo mudanças quantitativas no florescimento em resposta a diferentes períodos de vernalização (Sheldon *et al.*, 2000). No entanto, a repressão do gene *FLC* é encerrada na meiose e permite que a resposta à vernalização seja readquirida na próxima geração (Sheldon *et al.*, 2000).

2.7 Regulação do florescimento em *Arabidopsis* e cereais

A rota de resposta ao comprimento do dia é conservada em *Arabidopsis* e cereais. Em ambos os grupos de plantas; dicotiledôneas e monocotiledôneas, o

gene *CONSTANS* (*CO*) desempenha uma papel central no florescimento. Em condições de fotoperíodo de dias longos, o gene *CO* induz à super-expressão do gene *FT*, o qual acelera o florescimento. Em cereais, a expressão do gene *CO* é dependente do gene *PPD1* (Kardailsky *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2002; Corbesier *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2007).

O mecanismo que integra resposta à vernalização e comprimento do dia também é similar em *Arabidopsis* e cereias. A vernalização é um pré-requisito para a indução do gene *FT* em condições de dias longos em ambos os grupos de plantas. No entanto, a rota de vernalização evoluiu independentemente em *Arabidopsis* e cereais (Figura 1). Em *Arabidopsis*, o gene *FLC* impede a indução do gene *FT* em condições de dias longos, porém sua expressão é inibida pela vernalização. Em cereais, o gene *VRN2* inibe a indução de *FT* em condições de dias longos e o gene *VRN1* é induzido pela vernalização, reprime a expressão de *VRN2* e induz à transcrição do gene *FT* (Figura 1).

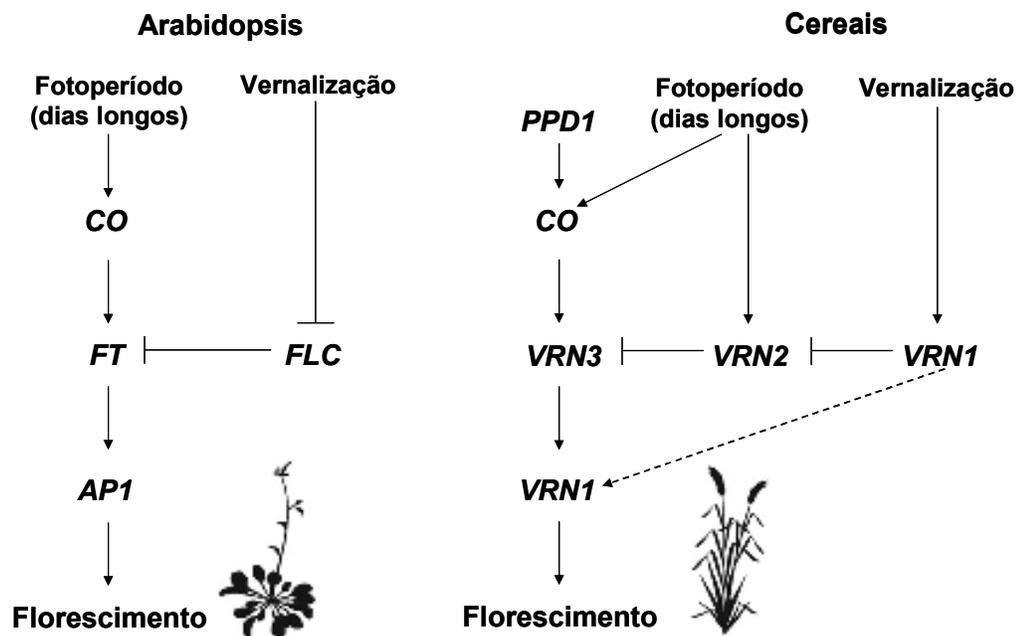


FIGURA 1. Comparação das rotas moleculares regulando florescimento em *Arabidopsis thaliana* e cereais temperados. Modelo modificado a partir de Trevaskis *et al.*, 2007.

Em *Arabidopsis*, as rotas de resposta à vernalização e comprimento do dia convergem no gene *FT*, o qual pode ser descrito como gene integrador do florescimento. Em cereais, o gene integrador do florescimento é *VRN2*. Tanto em *Arabidopsis*, como em cereais, a ativação do florescimento causa expressão de genes que promovem identidade do meristema floral, tal como *APETALA 1 (AP1)* em *Arabidopsis* e *VRN1* em cereais. O gene *VRN1* atua como gene promotor do florescimento nas rotas de resposta à vernalização e como gene de identidade do meristema floral durante o desenvolvimento reprodutivo (Trevaskis *et al.*, 2007).

2.8 Nível de conservação dos genes de vernalização

Os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* apresentam elevado índice de similaridade molecular em trigo e cevada e são considerados ortólogos nestas espécies. O gene *VRN1* é similar aos genes de identidade do meristema floral *APETALA1 (AP1)*, *FRUITFUL (FUL)* e *CAULIFLOWER (CAL)* em *Arabidopsis thaliana* (Yan *et al.*, 2003). Esses genes são responsáveis pela transição do ápice vegetativo para o reprodutivo, a exemplo do gene *VRN1*. Embora a função destes genes seja conservada, a sua regulação parece ser diferente entre cereais e *Arabidopsis*. Variação alélica natural do loco *AP1* está associada com diferenças no requerimento à vernalização em trigo, mas não em *Arabidopsis* (Yan *et al.*, 2003).

Diferenças significativas nas rotas de resposta à vernalização entre cereais e *Arabidopsis* foram observadas apenas para genes envolvidos na repressão do florescimento (Dubcovsky *et al.*, 2006). Nenhum ortólogo ao gene *VRN2* de trigo e cevada foi identificado em *Arabidopsis* e arroz. O mesmo ocorre com o gene *FLC*, o qual não possui um gene homólogo claro em cereais (Yan *et al.*, 2004b).

Em *Arabidopsis thaliana*, o gene *FLC* atrasa o florescimento pela repressão da expressão do gene *Flowering Locus T (FT)* nas folhas (Wigge, 2005; Abe *et al.*, 2005; Searle *et al.*, 2006). Entretanto, a vernalização reprime o gene *FLC* e permite a expressão do gene *FT*, o qual induz a expressão do gene *AP1*. O gene *FT* em *Arabidopsis* é considerado ortólogo ao gene *VRN3* de trigo e cevada e, aos genes *Hd1* e *Hd3a* do arroz (Yan *et al.*, 2006).

2.9 Mecanismos epigenéticos de regulação da resposta à vernalização

Em *Arabidopsis*, a repressão transcricional do gene *FLC* pela vernalização é controlada por proteínas que modificam histonas (Sung & Amasino, 2004; Bastow *et al.*, 2004). Os resíduos metilados das histonas desencadeiam mudanças conformacionais na estrutura da cromatina e impedem que a transcrição do gene *FLC* ocorra (Sung & Amasino, 2004; Bastow *et al.*, 2004). Modificações das histonas do gene *FLC* permanecem estáveis durante todo o ciclo de vida das plantas, através de sucessivas divisões mitóticas. A regulação epigenética da atividade do gene *FLC* fornece as bases moleculares para a memória somática da vernalização em *Arabidopsis*, a qual é apagada à cada geração.

Em cereais, a resposta à vernalização deve envolver regulação epigenética do gene *VRN1*. A vernalização tem um efeito acumulativo na atividade transcricional do gene *VRN1*, a qual não é transmitida para a geração seguinte. A região promotora e o primeiro íntron devem ser os principais alvos da repressão transcricional do gene *VRN1*, via modificações de histonas, de maneira similar à repressão do gene *FLC* em *Arabidopsis* (Trevaskis *et al.*, 2007). Desta forma, modificações das histonas manteriam o gene *VRN1* em um estado reprimido até que as plantas tenham sido vernalizadas. Após a vernalização, complexos protéicos

seriam capazes de reverter as modificações das histonas e ativar a expressão do gene *VRN1*, para promover o florescimento.

A clonagem dos genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* proporcionou um grande avanço no entendimento de como o florescimento é regulado pela vernalização e comprimento do dia em cereais. Estudos futuros sobre a função destes genes, envolvendo plantas transgênicas ou genética reversa poderão oferecer maiores evidências sobre o controle do florescimento em cereais. Além disso, será possível examinar se o gene *VRN1* está sujeito à regulação epigenética durante a vernalização e como este gene interage com outros genes como *VRN2* e *VRN3*, para controlar a atividade da rota de resposta ao comprimento do dia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Efeito da vernalização sobre o florescimento em aveia

Dez genótipos de aveia foram avaliados quanto à resposta de sensibilidade e insensibilidade ao tratamento de vernalização. O experimento foi conduzido no telado do departamento de Plantas de Lavoura, na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS, nos meses de novembro de 2004 a janeiro de 2005. Entre os genótipos avaliados neste estudo, oito pertenceram ao Programa de Melhoramento de Aveia da UFRGS (UFRGS 8, UFRGS 930605, UFRGS 881971, UFRGS 19, UFRGS 017142-2, UFRGS 017164, UFRGS 02B6182-2-4 e UFRGS 028143-2) e dois genótipos foram desenvolvidos pela Universidade de Minnesota, nos Estados Unidos, (Amagalon/4*Ogle e Cocker492/Starter-1).

A metodologia de vernalização empregada neste estudo foi adaptada para aveia a partir da metodologia descrita para trigo (Lagos *et al.*, 1982). Sementes de cada genótipo foram embebidas em álcool 60% (dois minutos), lavadas e mantidas submersas em água destilada (uma hora) para promover a hidratação das sementes. As sementes foram pré-germinadas em papel germinador, em temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) por um período de 48 horas. Após esse período, as sementes pré-germinadas foram transferidas para geladeira com temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para promover o tratamento de vernalização.

Quatro tratamentos de vernalização foram aplicados, de acordo com a duração do período de exposição ao frio: 0, 10, 20 e 30 dias. O tratamento zero ou não-vernalizado consistiu apenas de pré-germinação, realizada 48 horas antes da transferência das sementes ao solo. O delineamento completamente casualizado, com três repetições foi empregado. Cada repetição foi constituída de dez sementes de cada genótipo e tratamento de vernalização e semeadas em linha, com espaçamento de 20 cm entre linhas e dez centímetros entre plantas, no dia 04 de novembro de 2004.

O florescimento foi determinado no início da emergência da panícula de cada planta (estádio 50 da escala Zadok). A partir da data de florescimento foi possível determinar o número de dias da semeadura ao florescimento (NDF) para cada genótipo, dentro de cada tratamento e repetição. Os dados observados foram submetidos à análise de variância, com a utilização do teste F a 1% de probabilidade, afim de detectar diferenças entre os genótipos submetidos aos diferentes tratamentos de vernalização. Valores médios do NDF para cada genótipo em cada tratamento de vernalização foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os genótipos que apresentaram diferenças significativas ao tratamento de vernalização, uma análise de regressão foi aplicada para determinar a resposta do florescimento em função do tratamento de vernalização. O coeficiente de regressão (b) foi testado pelo teste t a 5% de probabilidade (Steel & Torrie, 1980).

3.2 Avaliação do florescimento em linhagens recombinantes de aveia sob condições de campo

Genótipos brasileiros de aveia foram avaliados quanto ao caráter florescimento, sob condições naturais de cultivo. Os experimentos foram conduzidos

na estação experimental do Eastern Cereal and Oilseed Research Centre of Agriculture and Agri-Food Canada, localizada na cidade de Ottawa, no ano de 2007.

Linhagens recombinantes desenvolvidas através dos cruzamentos 'UFRGS 8 x UFRGS 930605' e 'UFRGS 881971 x Pc68/*Starter' foram empregadas neste estudo. Afim de simplificar a nomenclatura, daqui em diante, os genitores UFRGS 8, UFRGS 930605, UFRGS 881971 e Pc68/*Starter serão descritos como U8, U605, U71 e Pc68, respectivamente. Ambas as populações foram desenvolvidas pelo método SSD (*Single Seed Descendent*) sem seleção até a geração F₅. A escolha destas populações foi realizada a partir da resposta diferencial à vernalização exibida entre os genitores de cada população, observados na etapa 3.1 deste trabalho e por Locatelli *et al.*, (2008). Desta forma, os genitores U605 e U71 apresentam resposta de sensibilidade à vernalização, enquanto que os genitores U8 e Pc68 são insensíveis à vernalização.

O florescimento foi avaliado em duas épocas distintas de semeadura; cedo e tarde. A semeadura do cedo foi realizada no dia 03/05/2007 e no dia 25/05/2007 na semeadura do tarde. A emergência das plantas no cedo ocorreu no dia 12/05/2007 e, para a época do tarde em 01/06/2007. A população U8 x U605 foi composta por 154 linhagens recombinantes + genitores e a população U71 x Pc68 foi representada por 142 linhagens recombinantes + genitores. Assim, um total de 300 genótipos foram avaliados em cada época de semeadura. Aproximadamente 20 sementes de cada genótipo foram semeadas no sistema de cova, sem repetições. As covas foram espaçadas em 0,5m entre si e 1,0m entre linhas de covas. O controle de plantas daninhas foi realizado manualmente e o controle de pragas e doenças através do método químico, sempre que houve necessidade.

O número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) foi a principal variável observada neste estudo. A data de florescimento foi atribuída individualmente a cada genótipo, dentro de cada época de semeadura, quando mais de 50% das plantas dentro da cova apresentavam panícula exposta (estádio 55 da escala Zadok). Os resultados de florescimento foram submetidos à análise qualitativa, com base na distribuição de frequência do NDEF, para cada população e época de semeadura testada. A resposta à semeadura do cedo (RSC) foi estimada através da fórmula: $RSC = NDEF_{tarde} - NDEF_{cedo}$. Os resultados também foram submetidos à distribuição de frequência da RSC para cada população. A definição do intervalo de classe e do número de classes levou em consideração a amplitude total de variação do NDEF e da RSC entre as linhagens avaliadas em cada população (Steel & Torrie, 1980).

3.3 Análise genética da resposta à vernalização em linhagens recombinantes de aveia

A fim de avaliar a resposta à vernalização e o número de genes envolvidos no controle desta resposta em aveia, um experimento foi conduzido em casa de vegetação no Eastern Cereal and Oilseed Research Centre of Agriculture and Agri-Food Canada, localizada na cidade de Ottawa, no ano de 2007. As populações 'U8 x U605' e 'U71 x Pc68' foram empregadas neste estudo. O número de linhagens recombinantes avaliadas foi o mesmo descrito no item 3.2, para ambas as populações. Os genitores e linhagens recombinantes foram submetidos aos tratamentos vernalizado (VERN) e não-vernalizado (NVERN), no deliamento completamente casualizado, em duas repetições.

O tratamento vernalizado consistiu da pré-germinação de quatro sementes de cada genótipo. A pré-germinação foi conduzida em temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por um período de três dias, em bandejas plásticas, com solo esterilizado. Grande parte das plântulas apresentavam coleóptilo com tamanho próximo a um centímetro ao final do período de pré-germinação. As plântulas foram então transferidas para uma câmara fria para receberem o tratamento de vernalização, com temperatura e comprimento do dia ajustados em 2°C e 14 horas de luz/dia, respectivamente. As plântulas permaneceram nestas condições por três semanas e nenhum suprimento hídrico e de adubação foi fornecido durante o período de vernalização.

O tratamento não-vernalizado consistiu apenas da pré-germinação de quatro sementes de cada genótipo. A pré-germinação também foi realizada em temperatura ambiente, em bandejas plásticas e com o mesmo solo utilizado para o tratamento vernalizado. No entanto, o período de pré-germinação para o tratamento não-vernalizado ocorreu em quatro dias e não em três dias como descrito para o tratamento vernalizado. Isso foi necessário para obter o mesmo tamanho das plântulas em ambos os tratamentos, uma vez que um pequeno crescimento das plântulas foi observado durante o tratamento de vernalização.

Plântulas vernalizadas e não-vernalizadas foram então transferidas para casa de vegetação no dia 01 de junho de 2007. A temperatura dentro da casa de vegetação foi mantida em torno de 24°C , com auxílio de aeradores internos. O comprimento do dia durante o período de condução do experimento variou de 14 a 15 horas de luz. A umidade do solo foi mantida constante através de monitoramento e suprimento hídrico diário. Duas adubações nitrogenadas foram realizadas durante

o período de crescimento vegetativo das plantas. O controle de doenças e pragas foi realizado pelo método químico, sempre que houve necessidade.

Uma semana após a transferência das plântulas para a casa de vegetação, apenas duas plantas de cada genótipo foram mantidas, através de desbaste. Assim, o florescimento foi determinado para duas plantas individuais de cada genótipo, nos diferentes tratamentos de vernalização. O número de dias ao florescimento foi considerado a partir da data de transferência das plântulas para casa de vegetação, até a emissão da inflorescência de cada planta (estádio 50 da escala Zadok).

A resposta à vernalização (RVERN) foi determinada através da diferença no número de dias ao florescimento entre os tratamentos não-vernalizado e vernalizado. A classificação final das linhagens de acordo com a resposta à vernalização levou em consideração o desvio padrão populacional da RVERN. Desta forma dois grupos foram formados; grupo I (com resposta à vernalização) e grupo II (sem resposta à vernalização). O limite de classificação e/ou ponto de corte entre os dois grupos baseou-se na $RVERN = 0 \pm$ um desvio padrão.

O número de genes envolvido no controle da resposta à vernalização foi determinado através da distribuição de frequência da variável resposta à vernalização (RVERN), estimado pelo número de dias ao florescimento médio de cada linhagem recombinante, para cada população. O número de classes e o intervalo entre classes foi determinado de acordo com o modelo proposto por Steel & Torrie, (1980). A partir dos resultados obtidos, uma hipótese genética para a resposta à vernalização foi formulada e a diferença das frequências observadas e esperadas foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado - χ^2 (Steel & Torrie, 1980).

3.4 Clonagem de genes associados à vernalização em aveia

O presente estudo foi conduzido no laboratório de estudos moleculares em aveia do Eastern Cereal and Oilseed Research Centre of Agriculture and Agri-Food Canada, Central Experimental Farm, na cidade de Ottawa, em 2007. Inúmeras técnicas moleculares e ferramentas de bioinformática foram empregadas no desenvolvimento deste trabalho, as quais estão descritas a seguir.

3.4.1 Material genético

Sete genótipos de aveia com resposta diferenciada à vernalização foram selecionados para esse estudo. Estes genótipos representaram os genitores de quatro cruzamentos distintos: U8 x U605, U71 x Pc68, Kanota x Ogle (K x O) e Kanota x TAMO-301 (K x T). Os genitores U605, U71 e Kanota são conhecidos por apresentarem resposta positiva à vernalização. U8, U605 e U71 são genótipos brasileiros de aveia, enquanto que Pc68, Kanota, Ogle e TAMO-301 foram desenvolvidos nos Estados Unidos. O DNA desses genótipos foi isolado através do método de extração de DNA em larga escala, seguindo o protocolo descrito por Wight *et al.*, (2003).

3.4.2 Identificação de genes de vernalização ortólogos em gramíneas

Os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* presentes em espécies gramíneas como trigo, cevada e azevém foram selecionados como genes alvos e/ou candidatos para clonagem em aveia hexaplóide (*Avena sativa* L.). Esses genes foram recentemente clonados e mapeados, os quais estão envolvidos em etapas chaves de rotas moleculares em resposta à vernalização e comprimento do dia. Sequências associadas aos genes de vernalização em gramíneas foram identificadas através de

uma análise detalhada de sequências depositadas no banco de dados moleculares público, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

Setenta e seis sequências de DNA genômico e codificantes (cDNA) associadas ao genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* de gramíneas foram selecionadas a partir do GenBank. As sequências derivadas de gramíneas e candidatas a serem amplificadas em aveia foram transferidas para uma base de dados local e classificadas de acordo com espécie, gene e função.

3.4.3 Alinhamento múltiplo de sequências

Alinhamentos múltiplos ou heterólogos de sequências derivadas de trigo, cevada e azevém foram realizados para cada um dos três genes de vernalização candidatos. Sequências de DNA genômico e codificantes completas foram alinhadas usando a ferramenta CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) disponível no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

Após cada alinhamento, uma sequência consenso ou de concordância entre as diferentes sequências alinhadas foi gerada. A sequência consenso representou regiões codificantes conservadas para cada gene de vernalização, entre as sequências e espécies de gramíneas empregadas. A sequência consenso gerada para cada gene de vernalização foi alinhada com uma sequência completa e específica ao gene, pelo programa EST2GENOME (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=est2genome>). Esse alinhamento visou a identificação e localização de íntrons presentes na sequência consenso. A sequência consenso para o gene *VRN1* foi alinhada com a sequência 58422999 derivada de trigo hexaplóide (Fu *et al.*, 2005). A sequência consenso para o gene *VRN2* foi alinhada com a sequência 94982315 de cevada (Szucs *et al.*, 2006). A

sequência consenso para o gene *VRN3* foi alinhada com a sequência 117168405 de trigo (Yan *et al.*, 2006). As sequências 58422999, 94982315 e 117168405 foram extraídas do GenBank.

3.4.4 Desenvolvimento de primers

Para cada sequência consenso, primers ancorados em regiões codificantes conservadas de espécies gramíneas foram desenvolvidos com auxílio do programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Os seguintes parâmetros foram levados em consideração no desenvolvimento dos primers: a) tamanho dos produtos de amplificação esperado entre 150 e 2000 pares de bases (pb); b) tamanho da sequência do primer mínimo com 18 nucleotídeos, ótimo com 20 nucleotídeos e máximo com 24 nucleotídeos; c) temperatura de anelamento mínima em 55°C, ótima em 60°C e máxima em 63°C e; d) concentração ótima de bases GC (guanina/citosina) em 50%.

Isto resultou no desenvolvimento de 12 pares de primers (orientação direta e reversa) para o gene *VRN1*, três pares de primers para o gene *VRN2* e sete pares de primers para o gene *VRN3*. Assim, um total de 22 pares de primers ancorados em regiões codificantes conservadas de trigo, cevada e aveia foram utilizados para amplificar sequências de aveia e associadas aos genes de vernalização.

3.4.5 Reações de amplificação

Os primers desenvolvidos para os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* foram inicialmente testados nos genótipos parentais U8, U605, U71 e Pc68. Reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram conduzidas usando termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). Cada reação foi realizada

em um volume de 25 μ L contendo 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP e 2,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA).

A temperatura de anelamento ótima para cada par de primer foi determinada através de um gradiente de temperaturas, variando de 53°C to 65°C. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos com temperatura de anelamento específica para cada par de primer e dois minutos a 72°C (extensão). Uma reação final de extensão foi conduzida a 72°C por um período de dez minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2%.

3.4.6 Purificação de DNA, clonagem e sequenciamento

As combinações de primers que geraram produtos de amplificação (*amplicons*) com tamanho esperado, baseado no alinhamento de sequências foram selecionadas para as etapas de clonagem e sequenciamento. Seis pares de primers foram selecionados para o gene *VRN1*, três pares de primers para o gene *VRN2* e quatro pares de primers para o gene *VRN3*.

As reações de PCR realizadas nesta etapa seguiram as mesmas condições de amplificação descritas acima, com excessão da enzima Taq Polimerase, a qual foi substituída pela enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA). Fragmentos de amplificação e/ou bandas individuais foram excisadas a partir de gel de agarose 1.5%. O DNA das bandas foi purificado através do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI). O DNA purificado foi analisado quanto à qualidade e concentração em espectrofotômetro e em gel de agarose 2%. O DNA purificado foi reamplificado com a mesma combinação de primers, uma vez que a concentração de DNA observada tanto em

espectrofotômetro, como em gel de agarose foi baixa. As reações de reamplificação seguiram as mesmas condições de amplificação descritas no item 3.4.4

As reações de clonagem ou ligação foram realizadas em um volume final de 6 μL , contendo 4 μL do produto de reamplificação, 1 μL de solução salina (1.2 M NaCl, 0,06 M MgCl_2) e 1 μL do vetor pCR®4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). A reação foi misturada gentilmente e incubada em temperatura ambiente (22 – 23°C) por 12 minutos e mantidas em gelo após esse período.

Um volume de 2 μL da reação de clonagem foi utilizado para a transformação de células competentes da bactéria *Escherichia coli* (DH5 α), pelo método de choque térmico. Células transformadas foram mantidas em meio SOC (fornecido pelo *kit* de clonagem), sob agitação (200 rpm) a 37°C por um período de uma hora. Para cada reação de transformação, 250 μL de células transformadas foram divididos e distribuídos igualmente em cinco placas de Petri contendo meio de cultura LB (peptona 10g/L + extrato de levedura 5g/L + 5g/L NaCl) pré-aquecido a 37°C. O antibiótico canamicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi utilizado no meio de cultura como agente seletivo. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 12 a 14 horas.

Oito a 12 colônias individuais para cada reação de clonagem foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB líquido + antibiótico canamicina. Cada colônia foi incubada a 37°C, sob agitação (100 rpm) por um período de 14 horas (*overnight*), para promover a multiplicação das colônias. Um controle negativo também foi empregado para cada reação de clonagem, onde o meio de cultura LB foi incubado livre de inoculação.

Após o período de incubação, os tubos contendo meio de cultura e células crescidas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso em 500 μL de sulfato de magnésio

(MgSO₄ 10mM). A solução estoque em MgSO₄ foi transferida para tubos Eppendorf 1,5 ml, os quais foram devidamente identificados. Os tubos foram então levados para um bloco de aquecimento e a solução estoque foi aquecida a 100°C por um período de 10 minutos para promover a purificação dos plasmídeos. A solução foi centrifugada em alta velocidade (12500 rpm) por cinco minutos, afim de remover debris celulares presentes na solução. O sobrenadante foi armazenado em geladeira a 4°C.

A etapa de amplificação dos insertos foi conduzida em duas reações principais. Na primeira reação, 5 µL do sobrenadante obtido na etapa acima foram adicionados ao coquetel contendo 59 µL de água destilada, 10 µL de Taq *Buffer* 10X e 6 µL de MgCl₂ (25 mM). A reação foi incubada a 94°C por 30 minutos em termociclador. Na segunda reação, 20 µL obtidos da primeira reação foram adicionados ao coquetel contendo 11 µL de água destilada, 8 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,25 µL do primer M13 *Forward* (25 ng/µL), 0,25 µL do primer M13 *Reverse* (25 ng/µL) 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 a 72°C por um período de dez minutos e mantida a 4°C. O produto de amplificação dos insertos foi resolvido em gel de agarose 2%.

A seleção de clones para sequenciamento foi baseada nos resultados obtidos em gel de agarose na etapa de amplificação de insertos. O número de clones submetidos variou entre as diferentes reações de clonagem. Número superior de clones foram sequenciados para as reações de clonagem que apresentaram maior variação no tamanho de insertos. A reação de sequenciamento para cada clone foi realizada através da adição de 1 µL da reação de amplificação de insertos obtida na

etapa anterior em 8,5 μ L de Master Sequencing Mix e 0,5 μ L do primer M13 *Forward* (3,2 μ M).

Apenas primers com orientação 5' – 3' (direto) foram inicialmente marcados e submetidos para sequenciamento. Para as sequências que apresentaram similaridade ao gene alvo, o sequenciamento complementar com primer 3' – 5' (reverso) foi conduzido. As reações de sequenciamento foram realizadas sob as condições: 1 minuto a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e dois minutos a 60°C e mantidas a 4°C. O sequenciamento foi realizado em equipamento ABI 3130 xl Genetic Analyzer Polymers (Applied Biosystems Inc).

3.4.7 Análise de sequências codificantes de aveia

Sequências de aveia derivadas da clonagem e sequenciamento foram exportadas a partir de cromatogramas com auxílio do programa Chromas Lite (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) e salvas em formato FASTA. Sequências do vetor presentes nas sequências de aveia foram removidas manualmente.

Sequências de aveia foram alinhadas e comparadas com sequências disponíveis no GenBank através da ferramenta BLAST (*Basic Linear Alignment Sequence Tool*). As sequências que não apresentavam nenhuma similaridade com sequências presentes no GenBank foram descartadas. Para aquelas sequências que apresentaram identidade ao gene alvo ou outros genes, uma caracterização detalhada foi realizada.

A variabilidade molecular em sequências de aveia foi estimada através da frequência de Polimorfismos de Base Única (SNPs) presentes nas sequências dos

diferentes genitores de aveia, para a mesma combinação de primers. Esta análise foi realizada pelo programa Seqman (DNASTAR Inc., Madison, WI). Sequências de aveia também foram comparadas com sequências associadas aos genes de vernalização em trigo pelo programa bl2seq disponível no GenBank, o qual realiza o alinhamento entre duas sequências.

3.5 Análise de arranjos de diversidade – DArT

A análise de arranjos de diversidade (Diversity Arrays Technology – DArT) foi realizada para as populações U8 x U605 e U71 x Pc68. A tecnologia de DArT é um sistema de genotipagem baseado em uma plataforma de microarranjos, independente de informações prévias do genoma, a qual produz dados em grande escala (*high-throughput*) e baixo custo (Jaccoud *et al.*, 2001). As principais etapas envolvidas neste estudo estão descritas a seguir.

3.5.1 Material vegetal

A análise de arranjos de diversidade - DArT foi realizada para as populações de mapeamento de aveia U8 x U605 e U71 x Pc68. A população U8 x U605 foi composta por 150 linhagens recombinantes, enquanto que a população U71 x Pc68 foi composta por 128 linhagens recombinantes. As linhagens recombinantes mapeadas neste estudo foram as mesmas avaliadas quanto ao florescimento em condições de campo (item 3.2) e resposta à vernalização em casa de vegetação (item 3.3).

Aproximadamente dez sementes de cada linhagem recombinante foram semeadas em bandejas plásticas e crescidas em casa de vegetação. Plantas inteiras foram coletadas quando apresentavam 15 a 20 cm de altura. O tecido

vegetal foi imediatamente transferido para nitrogênio líquido e macerado. O tecido macerado foi mantido em tubo Falcon 50 ml (~ 20 ml de tecido) e armazenado em ultra-freezer a -70°C até a etapa de extração de DNA genômico.

3.5.2 Extração de DNA genômico

A extração de DNA foi realizada através de método em larga escala (Wight *et al.*, 2003). As principais etapas de extração envolveram a adição de 30 ml de tampão de extração (100mM Tris (hidroximetil) aminometano-HCl pH 8,0, 50mM ácido etilenoediaminatetracético (EDTA) pH 8,0 e 500mM NaCl) aquecido (65°C) em cada tubo contendo o tecido macerado. O tampão de extração e o tecido foram misturados com auxílio de um bastão de vidro. Dois mililitros do detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 20% foram adicionados à cada tubo e agitados vigorosamente. Os tubos foram incubados a 65°C (banho-maria) por 10 minutos. Dez mililitros da solução contendo acetato de potássio 5M foram adicionados ao tubo e novamente agitados. Os tubos foram mantidos em gelo por 20 minutos e posteriormente centrifugados a 9.000 rpm, 4°C durante 20 minutos em um rotor Beckman JA-12 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Proteínas e polissacarídeos foram depositados no fundo do tubo e resíduos vegetais presentes no sobrenadante foram filtrados com papel Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA). O sobrenadante filtrado contendo o DNA foi vertido em novos tubos Falcon 50 ml estéreis e preenchidos com etanol 95%. Os tubos foram mantidos em freezer por 14 a 16 horas para promover a completa precipitação do DNA. O pellet foi removido com uma pipeta de vidro Pasteur, transferido para um tubo Falcon 15 ml e lavado em etanol 70%. Após a lavagem, o pellet foi transferido para tubo eppendorf 1,5 ml estéril, submetido à um processo de secagem a vácuo e ressuspensão em 0,8 a 1,2

ml de solução TE (10mM Tris-HCl pH 8,0 – 1mM EDTA pH 8,0). Os parâmetros de qualidade e concentração do DNA foram determinados em gel de agarose 0,9%.

3.5.3 Purificação do DNA genômico

Assim como para todas as técnicas de genotipagem, a pureza do DNA tem grande efeito sob a qualidade dos dados gerados pela tecnologia de DArT. Desta forma, o DNA extraído foi submetido à um processo de purificação, a fim de remover o RNA e outras impurezas presente nas amostras. A purificação foi realizada em 400 µl da solução estoque de DNA obtida na etapa anterior. Quatro microlitros de RNase 100 mg/ml (Qiagen Inc., Chatworth, CA) foram adicionados ao DNA e os tubos foram mantidos a 37°C por 12 a 14 horas (*overnight*). Após esse período, a enzima RNase foi inativada pela adição de 400 µl de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1). A reação foi agitada através de inversão dos tubos e centrifugada em alta velocidade (12.000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para novo tubo eppendorf estéril, sem romper a interface entre as fases aquosa e orgânica. 800 µl de etanol 95% gelado foi adicionado ao tubo, misturado e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram submetidas à centrifugação (12.000 rpm) por 10 minutos para promover a precipitação do DNA. A solução contendo etanol foi descartada e o pellet foi lavado com 400 µl de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas, o etanol foi drenado e o DNA foi seco a vácuo e ressuspenso em 100 µl de TE 1X. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,9% e em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware).

3.5.4 Concentração e submissão do DNA para análise de DArT

Além da pureza, a concentração de DNA é outro fator importante para a análise de DArT. A concentração ideal para esta análise varia de 50 a 100 ng/ μ l. Assim, as amostras de DNA purificadas foram submetidas a novas diluições, até que a concentração desejada fosse alcançada. Todas as diluições foram realizadas com solução TE 1X. 50 μ l de DNA de cada genótipo foram transferidos para placas de PCR (96 *well*) e identificados de acordo com o número do genótipo. As placas foram devidamente seladas, identificadas e submetidas para análise na Austrália.

A análise de DArT por representar uma tecnologia recente, ainda não é empregada rotineiramente em laboratórios de estudos moleculares. Até o momento, apenas a companhia Diversity Arrays Technology Pty Ltd – DArTTM localizada na Austrália desenvolve esta análise. Informações e detalhes sobre a tecnologia estão disponíveis no endereço: (<http://www.diversityarrays.com/company.html>) e em diversos artigos científicos publicados nos últimos anos (Jaccoud *et al.*, 2001; Wenzl *et al.*, 2004; Wittenberg *et al.*, 2005; Akbari *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Hearnden *et al.*, 2007).

3.5.5 Preparo de representações genômicas

Diversos arranjos foram desenvolvidos durante o desenvolvimento da análise de DArT. Para cada um dos arranjos, uma representação genômica foi gerada a partir da mistura de DNA das linhagens recombinantes de aveia. As representações genômicas foram preparadas separadamente para cada uma das populações analisadas. A fim de reduzir a complexidade da representação genômica, 100 ng da mistura de DNA foram digeridos com duas unidades de ambas as enzimas de restrição *Pst*I (corte raro) e *Taq*I (corte frequente). Após a digestão, adaptadores

*Pst*I foram ligados aos fragmentos cortados pelas enzimas de restrição, através da enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 37°C por um período de três horas. Os fragmentos ligados aos adaptadores foram amplificados via reações de PCR, com as seguintes condições de amplificação: um minuto a 94°C, seguido por 30 ciclos de 20 segundos a 94°C (desnaturação), 40 segundos a 58°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão). Uma reação final de extensão foi conduzida a 72°C por um período de sete minutos.

3.5.6 Desenvolvimento de bibliotecas genômicas

Fragmentos amplificados na etapa anterior foram clonados através do vetor PCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Células competentes da bactéria *Escherichia coli* TOP10F' foram transformadas através do método de choque térmico. Colônias individuais contendo plasmídeo recombinante foram selecionadas e transferidas para 20 µl de solução glicerol 10%. Uma alíquota de 5 µl de cada amostra de glicerol foi utilizada para a reação de amplificação de insertos, com 15 pmol dos primers M13 (direto e reverso). A amplificação de insertos foi conduzida sob as seguintes condições: cinco minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 52°C (anelamento) e um minuto a 72°C (extensão). Após a amplificação, os produtos de PCR foram isolados através da precipitação com isopropanol, lavados com etanol 70% e secos a vácuo.

3.5.7 Preparo dos microarranjos de DNA

Os produtos de amplificação purificados acima, representaram clones aleatórios gerados a partir das representações genômicas. Estes produtos de PCR foram ressuspensos em 5 µl de água estéril filtrada e 5 µl do tampão dimetil

sulfoxido (DMSO). O DNA amplificado foi impresso (DArT *fingerprint*) em *slides* cobertos com um polímero da lisina (polilisina) através do equipamento MicroGrid II (Biorobotics, Cambridge, UK). Três repetições (painéis) de cada clone foram impressas no arranjo. Após a impressão, as placas foram aquecidas a 80°C por duas horas. O DNA presente nas placas foi desnaturado em água quente a 95°C por dois minutos e seco por centrifugação.

3.5.8 Genotipagem do DNA das linhagens recombinantes de aveia

Representações genômicas de linhagens individuais de aveia e redução da complexidade do DNA foram obtidas através da digestão com enzimas de restrição, ligação de adaptadores e amplificação dos fragmentos, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.5.5. Os produtos de amplificação resultantes de linhagens individuais foram precipitados, desnaturados e marcados com 0,3 µl do corante laranja cy3-dUTP (Amersham Biosciences, Castle Hill, NSW) e exo-Klenow da enzima DNA polimerase I da bactéria *Escherichia coli*. As representações marcadas também denominadas “alvos” foram misturadas com o corante vermelho cy5 e hibridizadas nas placas contendo a impressão dos clones gerados pela representação genômica da população. A hibridização foi realizada a 65°C por um período de 12 a 14 horas (*overnight*). Após a hibridização, as placas foram lavadas, secas por centrifugação e escaneadas usando o equipamento Affymetrix 418 Scanner (Santa Clara, CA).

3.5.9 Análise de imagens e identificação de polimorfismos

As imagens de microarranjos foram analisadas usando o programa DarTsoft versão 7.0. Clones que apresentaram diferenças genéticas foram identificados pelo

programa DarTsoft através da diferença na intensidade de sinais presentes nas imagens de microarranjos. Um clone foi considerado polimórfico quando os sinais de hibridização observados entre as diferentes linhagens foram classificados em dois grupos: a) baixo sinal de hibridização e; b) alto sinal de hibridização. Uma vez identificado a presença e ausência de sinais, clones que apresentaram variância entre os dois grupos inferior a 80% da variância total e probabilidade superior a 95% de pertencer à um dos dois grupos foram considerados polimórficos. Os polimorfismos foram classificados de acordo com a presença [1] versus ausência [0] de sinais de hibridização. Os resultados obtidos para cada polimorfismo ou marcador molecular foram submetidos à análise de segregação Mendeliana através do teste do Qui-quadrado e testados a 5% de probabilidade. Os marcadores que apresentaram distorção de segregação em relação as proporções Mendelianas de segregação esperadas foram excluídos. Uma nomenclatura preliminar foi atribuída aos marcadores neste estudo, seguindo a ordem de alocação dos polimorfismos dentro dos arranjos. No entanto, a nomenclatura deverá ser ajustada e padronizada ao sistema de identificação de marcadores moleculares DArT, antes de serem submetidos para publicação.

3.5.10 Construção dos mapas genéticos de ligação

A partir da matriz gerada pelo programa DarTsoft contendo os marcadores polimórficos entre as linhagens de aveia, mapas genéticos de ligação para as populações U8 x U605 e U71 x Pc68 foram desenvolvidos com o programa JoinMap, versão 3.0 (Ooijen & Voorrips 2001). Através deste programa foi possível determinar a ordem dos marcadores e a distância de ligação entre marcadores vizinhos. Grupos de ligação foram identificados usando LOD (*Logarithm of the odds*)

7,0. A máxima frequência de recombinação utilizada foi de 40% e as frequências de recombinação foram convertidas em distâncias genéticas (centiMorgans – cM) através da função Kosambi.

3.6 Mapeamento molecular do gene *VRN3* em aveia

O presente estudo foi desenvolvido no Eastern Cereal and Oilseed Research Centre of Agriculture and Agri-Food Canada, Central Experimental Farm, na cidade de Ottawa, em 2007. Este estudo descreve o mapeamento molecular do gene *VRN3* em três populações de aveia hexaplóide.

3.6.1 Populações de mapeamento

O gene *VRN3* foi mapeado nas populações de aveia U8 x U605, U71 x Pc68 e Kanota x Ogle (K x O), em gerações avançadas (geração F6 e/ou superior). O número de linhagens recombinantes analisadas para as populações U8 x U605, U71 x Pc68 e K x O foi de 150, 128 e 110 linhagens, respectivamente. As linhagens recombinantes das populações U8 x U605 e U71 x Pc68 empregadas neste estudo, corresponderam as mesmas linhagens submetidas para análise de arranjos de diversidade (DArT), descritas no capítulo anterior deste trabalho.

3.6.2 Primer polimórfico e reações de amplificação

O mapeamento do gene *VRN3* em aveia foi realizado com o primer Ver3-23. O primer Ver3-23 foi desenvolvido partir do alinhamento múltiplo de sequências do gene *VRN3* e apresenta a sequência nucleotídica GCAATGAGATGAGGACCTTCT (direto) e CGCTGGCAGTTGAAGTAGAC (reverso). Polimorfismos gerados por este primer foram inicialmente identificados nos genitores U8, U605, U71, Pc68, Kanota

e Ogle. A validação dos polimorfismos moleculares detectados entre os genitores foi realizada através de experimentos preliminares envolvendo 20 linhagens de cada uma das três populações analisadas. Como o mesmo padrão de amplificação foi observado entre genitores e linhagens, seguiu-se com o mapeamento molecular do gene *VRN3* em todas as linhagens de cada população.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µL contendo: 13 µL de água estéril, 2,5 µL tampão 10X, 2,5 µL de MgCl₂ 1,5 mM, 2,0 µL de dNTP 200 µM, 1,0 µL do primer Ver3-23 direto, 1,0 µL do primer Ver3-23 reverso, 0,5 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 2,5 µL de DNA de cada genótipo. O DNA empregado neste estudo foi obtido a partir da extração e purificação descritas no item 3.5. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos a 61°C (anelamento) e dois minutos a 72°C (extensão). Uma reação final de extensão foi conduzida a 72°C por um período de dez minutos. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 2%.

3.6.3 Análise de polimorfismos

Os polimorfismos foram analisados para cada linhagem recombinante, a partir de gel de agarose. A identificação dos polimorfismos entre as linhagens foi realizada através do sistema de discriminação de polimorfismos moleculares do programa MapMaker (Lander *et al.*, 1987). A partir deste sistema, as linhagens receberam escore 0 (zero), 3 ou 5. Escore “0” foi atribuído aos polimorfismos de baixa resolução, os quais não permitiram a perfeita discriminação entre os polimorfismos detectados para os genitores. Escore “3” foi atribuído para as linhagens que seguiram o padrão do genitor com alelos recessivos em homozigose

(ausência de banda) e escore “5” foi atribuído as linhagens que apresentavam padrão de banda igual ao genitor com alelos dominantes em homozigose ou em heterozigose (banda dominante). Os resultados da análise de polimorfismos moleculares foram submetidos à análise de segregação Mendeliana através do teste do Qui-quadrado e testados a 5% de probabilidade (Steel & Torrie, 1980).

3.6.4 Localização genômica do gene *VRN3* e mapeamento comparativo

Linhagens recombinantes que receberam escores 3 ou 5 foram consideradas para o mapeamento do gene *VRN3*. Polimorfismos moleculares do gene *VRN3* detectados nas populações U8 x U605, U71 x Pc68 e K x O foram integrados aos polimorfismos gerados a partir da análise de DArT realizada para as três populações. O mapeamento molecular foi realizado usando o programa JoinMap, versão 3.0 (Ooijen & Voorrips 2001), LOD 7,0 e máxima frequência de recombinação de 40%. Desta forma, a localização genômica do gene *VRN3* foi identificada em cada população, através da construção de mapas genéticos de ligação. A presença de marcadores moleculares em comum e/ou regiões genômicas colineares foi determinada através do mapeamento comparativo entre as diferentes populações de mapeamento empregadas.

3.6.5 Associação entre polimorfismos moleculares do gene *VRN3* e resposta à vernalização em aveia

Os resultados do mapeamento molecular do gene *VRN3* para as populações U8 x U605 e U71 x Pc68 foram comparados com os resultados obtidos na avaliação da resposta à vernalização em casa de vegetação (item 4.3). A associação entre polimorfismos moleculares do gene *VRN3* com os tratamentos vernalizado, não-

vernalizado e resposta à vernalização determinada através da diferença entre os tratamentos não-vernalizado e vernalizado, foi estimada através da análise de correlações (Steel & Torrie, 1980).

3.7 Mapeamento de QTLs associados com o florescimento e resposta à vernalização em aveia

A identificação de marcadores moleculares associados a QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que afetam o número de dias ao florescimento em aveia foi realizada para as populações U8 x U605 e U71 x Pc68. Para ambas as populações, a análise de QTLs foi realizada para as seguintes variáveis: 1) número de dias ao florescimento na semeadura do cedo (NDFcedo); 2) número de dias ao florescimento na semeadura do tarde (NDFtarde); 3) resposta à semeadura do cedo (RSC); 4) número de dias ao florescimento de plantas vernalizadas (VERN); 5) número de dias ao florescimento de plantas não-vernalizadas (NVERN) e; 6) resposta à vernalização (RVERN). As variáveis fenotípicas 1 a 3 foram determinadas em condições de campo (item 3.2), enquanto que as variáveis 4 a 6 foram determinadas em casa de vegetação (item 3.3).

Para a população U8 x U605, marcadores moleculares e mapas genéticos de ligação foram obtidos e desenvolvidos a partir da análise de arranjos de diversidade (DArT), marcadores moleculares AFLP desenvolvidos por Locatelli *et al.*, 2006 e mapeamento do gene *VRN3*. Desta forma, 265 marcadores moleculares DArT, sete marcadores AFLP e o gene *VRN3* foram integrados à análise de QTLs. Para a população U71 x Pc68, a análise de QTLs foi realizada a partir do mapa genético de ligação da população, composto por 313 marcadores DArT e o gene *VRN3*. Os 21 marcadores da população U8 x U605 e os 26 marcadores da população U71 x Pc68

que não apresentaram localização conhecida à nenhum dos grupos de ligação do mapa genético (item 4.5) também foram incluídos nesta análise. Para isso, o valor de LOD utilizado para gerar os grupos de ligação foi rebaixado para 4,0. Desta forma, a ordem de distribuição dos marcadores dentro e entre os diferentes grupos de ligação foi alterada em relação ao descrito no item 3.5.10.

QTLs associados ao número de dias ao florescimento em condições de campo e em resposta à vernalização foram identificados usando o programa “MQTL” (*Mapping of quantitative trait loci*) (Tinker & Mather, 1995). O programa MQTL realiza dois tipos principais de análise: a) mapeamento de QTLs por intervalo simples (SIM), o qual baseia-se em modelos lineares aditivos e; b) mapeamento de QTLs por intervalo composto simplificado (sCIM), o qual testa a presença de um QTL em uma posição específica do genoma em função da presença de outro QTL, através de coeficientes de regressão. No entanto, apenas o modelo de mapeamento por intervalo simples foi empregado neste estudo.

O efeito principal de um QTL foi estimado através de testes estatísticos (Ts) que determinam a razão de probabilidade de um dado QTL estar localizado entre marcadores adjacentes ligados. Os valores máximos do teste estatístico indicam a localização de inferência de um QTL no mapa genético de ligação. Para um QTL ser declarado como real ou verdadeiro, o valor máximo estimado para Ts deve ser superior ao nível de significância estabelecido. O nível de significância do Ts foi determinado pelo programa MQTL através de testes aleatórios de permutações. Através destes, todas as associações entre valores fenotípicos e marcadores moleculares foram quebradas (“embaralhadas”) e a análise de QTL foi realizada para estimar o nível de associações falso-positivas (taxa de erro tipo I) entre dados fenotípicos e marcadores moleculares. No presente estudo, os testes de

permutações foram repetidos 10.000 vezes ao acaso e QTLs foram declarados significativos a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da vernalização sobre o florescimento em aveia

No experimento realizado em Eldorado do Sul 2004/2005 foram detectadas diferenças significativas para o número de dias ao florescimento (NDF), genótipos, tratamentos e a interação genótipo*tratamento (Tabela 1). Estes resultados indicam a existência de variabilidade entre os genótipos testados quanto ao tratamento de vernalização. O baixo coeficiente de variação estimado (7,72%) demonstrou que as condições experimentais foram adequadas e que grande parte do erro experimental foi controlado e/ou minimizado (Tabela 1).

TABELA 1. Análise de variância para a variável número de dias da semeadura ao florescimento (NDF). EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS. 2005.

Causas de Variação	Número de dias ao florescimento (NDF)				CV (%)
	GL	QM	F	P > F	
Genótipo	9	463,70	47,56	<.0001**	
Tratamento	3	191,96	19,69	<.0001**	
Repetição	2	5,44	0,56	0,5749 ^{ns}	
Genótipo*Tratamento	26	72,33	7,42	<.0001**	
Erro Experimental	69	9,75			
Total	109				7,72

^{ns} e ** Não significativo e significativo a 1% de probabilidade, respectivamente.

Dos genótipos avaliados neste estudo, UFRGS 881971, UFRGS 930605 e UFRGS 017164 apresentaram florescimento precoce com o tratamento de vernalização. O genótipo UFRGS 881971 apresentou a maior resposta e/ou

sensibilidade à vernalização entre os genótipos avaliados. O NDF neste genótipo foi antecipado em 26 dias entre os tratamentos 0 (não-vernalizado) e 30 dias de vernalização. Para os genótipos UFRGS 930605 e UFRGS 017164, o NDF foi antecipado em 18 e 16 dias, respectivamente, entre os tratamentos 0 e 30 dias de vernalização (Tabela 2). Alguns genótipos (UFRGS 8, UFRGS 017147-2 e UFRGS 02B6182-2-4) atrasaram o florescimento quando submetidos à vernalização, entretanto, sem diferenças significativas ao tratamento não-vernalizado (Tabela 2).

TABELA 2. Florescimento médio e comparação de médias para genótipos de aveia avaliados em diferentes tratamentos de vernalização. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS. 2005.

Genótipo	Médias de florescimento (dias)			
	Vernalização (dias)			
	0	10	20	30
UFRGS 881971	65 a	55 b	40 c	39 c
AMAGALON	49 a	47 a	47 a	-
UFRGS 930605	60 a	45 b	42 b	42 b
UFRGS 8	42 a	43 a	42 a	47 a
COCKER	42 a	39 a	39 a	40 a
UFRGS 19	32 a	32 a	32 a	31 a
UFRGS 017147-2	33 a	36 a	39 a	33 a
UFRGS 017164	53 a	43 b	41 b	37 b
UFRGS 02B6182-2-4	35 a	37 a	38 a	35 a
UFRGS 02143-2	33 a	33 a	33 a	33 a

Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não são diferentes (Tukey P > 5% de probabilidade).

O efeito da vernalização sobre o florescimento em aveia também foi demonstrado por Locatelli *et al.*, 2008. Resposta positiva à vernalização foi determinada pelos autores para o genótipo UFRGS 881971, o qual antecipou o florescimento em 13 dias quando submetido à 20 dias de vernalização. Por outro lado, o genótipo UFRGS 930605 não apresentou resposta significativa ao tratamento de vernalização. Estes resultados não concordaram com os resultados observados no presente estudo, uma vez que o genótipo UFRGS 930605 antecipou

o florescimento em 18 dias entre os tratamentos 0 e 20 dias de vernalização (Tabela 2).

A baixa resposta à vernalização para o genótipo UFRGS 881971 e a ausência de resposta à vernalização para o genótipo UFRGS 930605 observados por Locatelli *et al.*, 2008, podem estar associadas as condições não indutivas de fotoperíodo em que as plantas foram crescidas. Os resultados sugerem que a vernalização *per se* não foi capaz de induzir ao florescimento, uma vez que genótipos com requerimento à vernalização apresentam em geral elevada sensibilidade ao fotoperíodo de dias longos, como demonstrado em diversos estudos e espécies (Lang & Melchers, 1965; Sorrels & Simmons, 1992).

A fim de isolar o efeito do fotoperíodo sobre a variável NDF e impedir que o efeito da vernalização fosse mascarado pelo fotoperíodo, o presente estudo foi conduzido nos meses de verão (novembro a janeiro). Desta forma, as plantas foram crescidas em uma condição de fotoperíodo indutiva e o efeito da vernalização sobre o número de dias ao florescimento pôde ser isolado. Embora, as temperaturas durante o período de condução do experimento foram elevadas, as plantas apresentaram um excelente vigor e biomassa, tanto na fase vegetativa, como na fase reprodutiva, não comprometendo os objetivos e os resultados do trabalho.

Para o genótipo UFRGS 881971, resposta significativa à vernalização foi observada após 10 dias de vernalização, porém inferior aos tratamentos com 20 e 30 dias. Já para os genótipos UFRGS 930605 e UFRGS 017164 não houve redução significativa no NDF após o tratamento de 10 dias de vernalização (Tabela 2). Estes resultados evidenciam a natureza quantitativa da vernalização, onde o aumento de exposição ao frio acelerou progressivamente a transição da fase vegetativa para a reprodutiva, até que a resposta atingiu o nível de saturação (Figura 2).

O número de dias necessários para a completa saturação pelo frio parece estar associado ao grau de requerimento à vernalização para um dado genótipo. Este efeito foi demonstrado pelo genótipo UFRGS 881971, o qual apresentou a maior resposta à vernalização e o maior número de dias de vernalização para atingir a saturação. O mesmo padrão foi descrito para cultivares de trigo e cevada com hábito de crescimento de inverno, os quais apresentam elevada resposta à vernalização e requerem em geral, cinco a seis semanas de exposição ao frio para atingirem a saturação (Henderson *et al.*, 2003).

A análise de regressão para os genótipos UFRGS 881971, UFRGS 930605 e UFRGS 017164 demonstrou efeito linear do número de dias de vernalização ao número de dias ao florescimento (Figura 2). Coeficientes de regressão linear significativos pelo teste t a 5% de probabilidade foram determinados apenas para os genótipos UFRGS 881971 e UFRGS 017164.

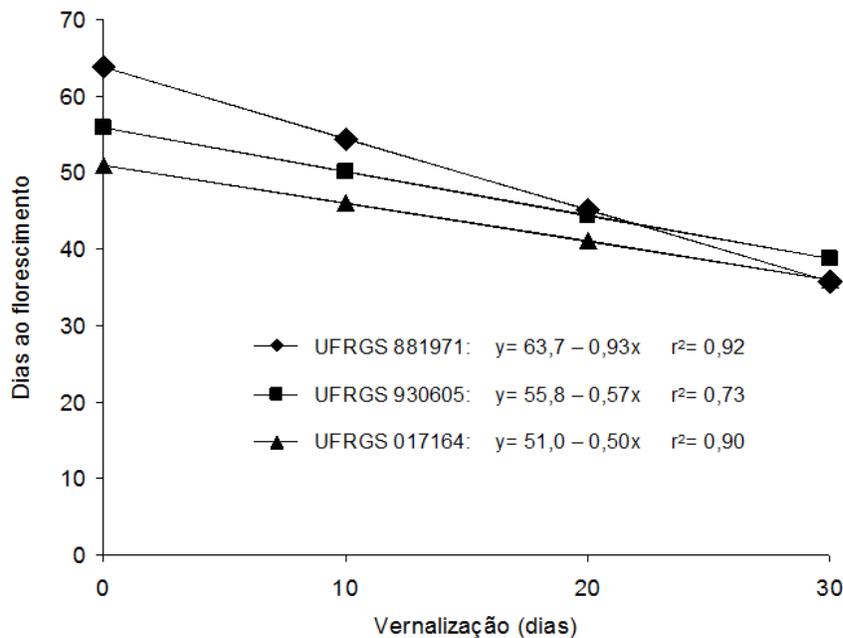


FIGURA 2. Número de dias ao florescimento (NDF) em resposta ao tratamento de vernalização. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS. 2005.

Coeficientes de regressão linear (b) negativos foram estimados para ambos os genótipos UFRGS 881971 e UFRGS 017164. Os coeficientes de regressão indicam que o número de dias ao florescimento decresceu de maneira linear, estimados em 0,93 e 0,50 dias para cada dia de exposição ao tratamento de vernalização, para os genótipos UFRGS 881971 e UFRGS 017164, respectivamente (Figura 2).

Valores elevados de coeficiente de determinação (r^2) foram estimados para ambos os genótipos UFRGS 881971 ($r^2 = 0,92$) e UFRGS 017164 ($r^2 = 0,90$) (Figura 2). Estes resultados demonstram que 92 e 90% da variação no número de dias ao florescimento para os genótipos UFRGS 881971 e UFRGS 017164 pode ser explicada pelos tratamentos de vernalização.

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho demonstram que alguns dos genótipos brasileiros de aveia testados neste estudo apresentam requerimento à vernalização. Estes resultados serviram como referência para o desenvolvimento de uma série de estudos que buscam o entendimento de fatores genéticos e moleculares associados com a resposta à vernalização. Os estudos correlatos estão descritos na sequência deste trabalho e envolvem a avaliação de componentes fenotípicos, genéticos e moleculares da resposta à vernalização em aveia.

4.2 Avaliação do florescimento em linhagens recombinantes de aveia sob condições de campo

Diferenças no número de dias da emergência ao florescimento (NDEF) foram determinadas para as populações U8 x U605 e U71 x Pc68 em duas épocas de semeadura (cedo e tarde). O NDEF quando avaliado no cedo para a população U8

x U605 variou de 33 a 48 dias entre linhagens recombinantes e 29 a 54 dias na semeadura do tarde. No entanto, 92% das linhagens avaliadas no cedo apresentaram dispersão do NDEF entre 33 e 40 dias e 93% das linhagens avaliadas no tarde apresentaram NDEF entre 29 e 40 dias (Figura 3).

Pequenas diferenças no florescimento foram observadas entre os genitores. O genitor U8 apresentou NDEF de 38 dias no cedo e 40 dias no tarde, enquanto que o genitor U605 não apresentou diferenças entre as épocas de semeadura (NDEF= 39). O NDEF médio entre as linhagens foi de 37 dias no cedo e 34 dias no tarde. O desvio padrão do NDEF em torno da média populacional foi de 2,3 dias para o experimento do cedo e 3,9 dias para o experimento do tarde (Figura 3).

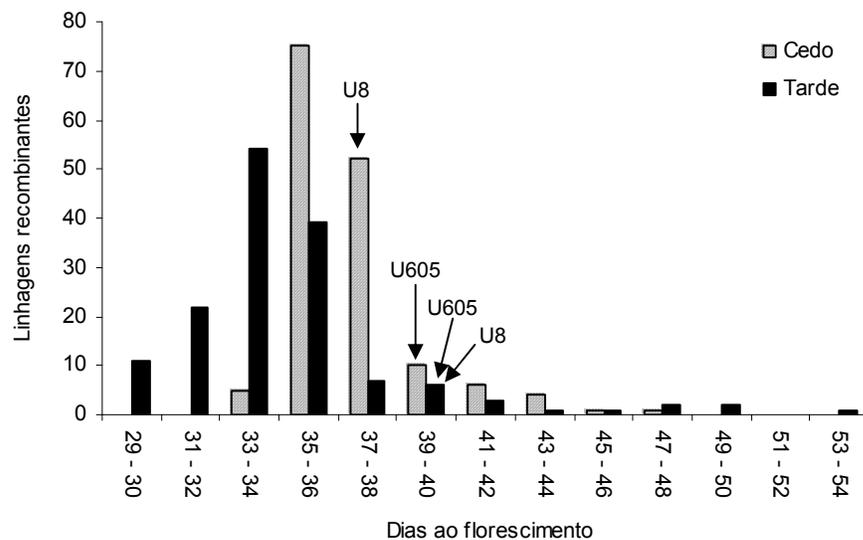


FIGURA 3. Distribuição do número de dias da emergência ao florescimento para linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre U8 x U605 avaliadas em duas épocas de semeadura. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

Para a população U71 x Pc68, o NDEF entre as linhagens variou de 34 a 48 dias quando avaliadas no cedo e 30 a 55 dias quando avaliadas no tarde. Entretanto, 97% das linhagens avaliadas no cedo apresentaram dispersão do NDEF

entre 34 e 41 dias e 94% das linhagens apresentaram dispersão do NDEF entre 30 e 43 dias quando avaliadas no tarde (Figura 4).

Os genitores U71 e Pc68 exibiram diferenças maiores para o NDEF entre as diferentes épocas de semeadura, quando comparados aos genitores U8 e U605. O genitor U71 floresceu 40 dias após a emergência na semeadura do cedo e 42 dias na semeadura do tarde. O genitor Pc68 apresentou NDEF de 37 dias na semeadura do cedo e 34 dias na semeadura do tarde. O NDEF populacional foi de 37 dias para linhagens avaliadas no cedo e 36 dias no tarde. O desvio padrão estimado do NDEF em torno da média foi de 2,1 dias para a semeadura do cedo e 4,3 dias para a época de semeadura do tarde (Figura 4).

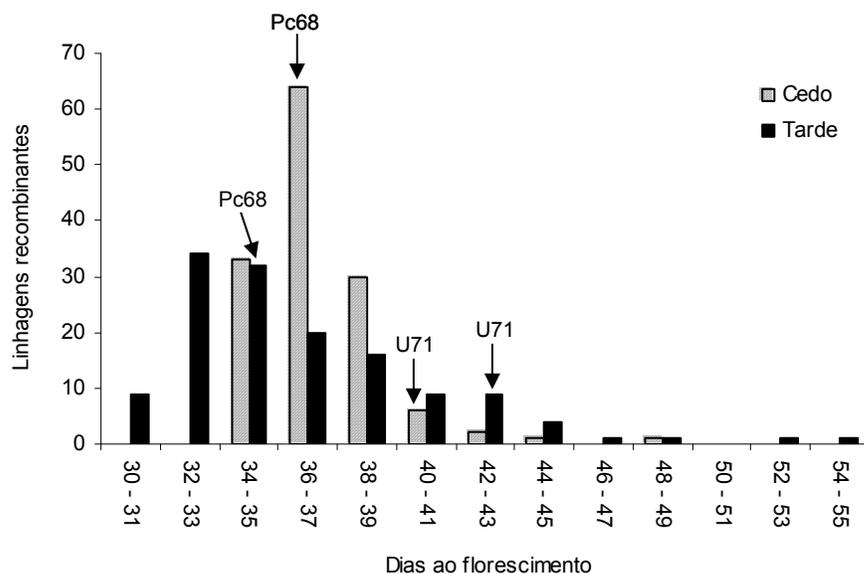


FIGURA 4. Distribuição do número de dias da emergência ao florescimento para linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre U71 x Pc68 avaliadas em duas épocas de semeadura. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

A resposta à semeadura do cedo (RSC) estimada pela diferença entre o $NDEF_{tarde}$ e $NDEF_{cedo}$ variou entre linhagens e populações. Para a população U8 x U605, 85% das linhagens apresentaram RSC negativa, indicando que o

florescimento foi antecipado na semeadura do tarde. Em 8% das linhagens, não foram observadas diferenças no número de dias ao florescimento entre as duas épocas de semeadura (RSC= 0) e, em 7% das linhagens, RSC positiva foi determinada, indicando que o florescimento foi atrasado na semeadura do tarde em relação à semeadura do cedo. Entre os genitores, U8 apresentou RSC positiva de dois dias e o genitor U605 apresentou RSC= 0 (Figura 5). A média da população foi de -2,2 dias e o desvio padrão de 2,7 dias.

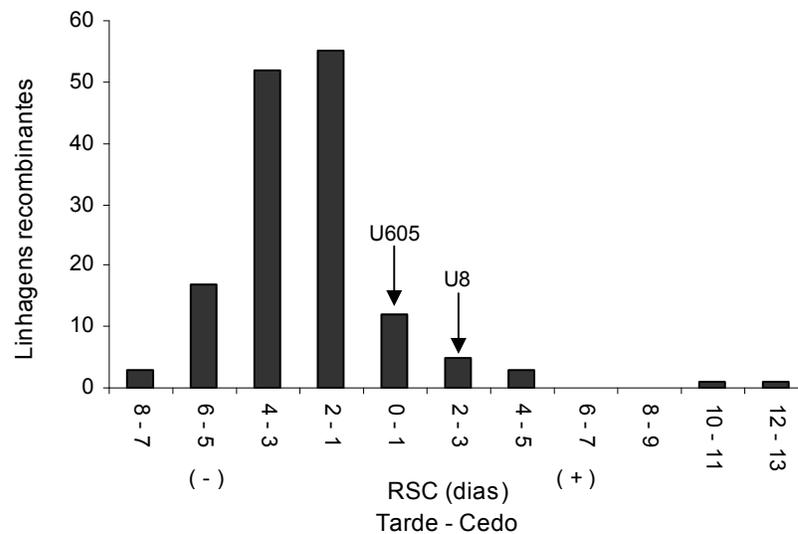


FIGURA 5. Distribuição da resposta à semeadura do cedo em linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

Para a população U71 x Pc68, 57% das linhagens recombinantes apresentaram RSC negativa. Para as demais linhagens, 17% não apresentaram diferenças no número de dias ao florescimento entre as diferentes épocas de semeadura (RSC= 0) e 26% das linhagens apresentaram RSC positiva. Entre os genitores, o florescimento foi atrasado em dois dias para U71 (RSC= 2d) quando semeado no tarde, enquanto que para o genitor Pc68, o florescimento foi antecipado em três dias (RSC= -3d) na semeadura do tarde em relação à

semeadura do cedo (Figura 6). A média da população foi de -0,8 dia e o desvio padrão de 3,02 dias.

Os resultados da RSC demonstraram que para um grande número de linhagens, o número de dias ao florescimento foi antecipado quando avaliado no tarde. Esta resposta pode ser atribuída em grande parte aos fatores temperatura (soma térmica) e comprimento do dia. Como os experimentos foram conduzidos na estação de crescimento primavera/verão (maio-julho) no Canadá, ambos os fatores temperatura e comprimento do dia foram superiores no experimento do tarde. Nestas condições, a taxa de desenvolvimento das plantas foi acelerada e, conseqüentemente, o período vegetativo reduzido.

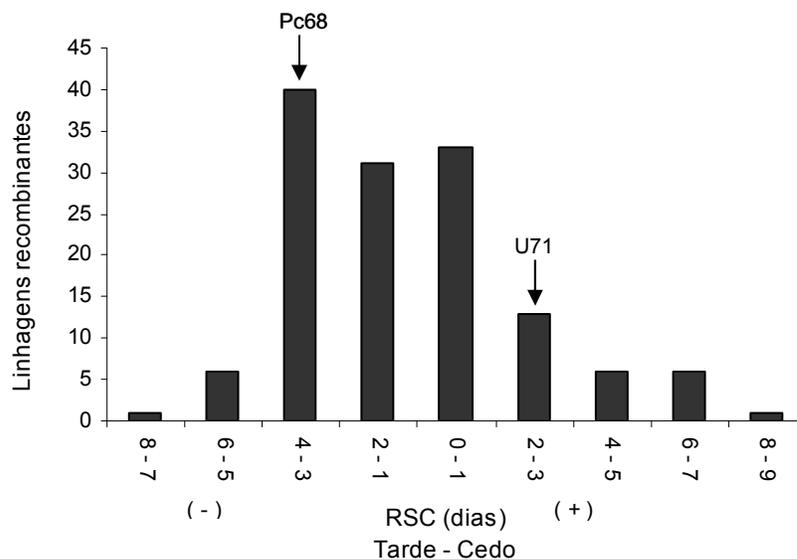


FIGURA 6. Distribuição da resposta à sementeira do cedo em linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

Temperaturas de 1 a 10°C consideradas efetivas à vernalização (Ritchie, 1993) foram observadas durante a fase inicial de crescimento das plantas, quando semeadas no cedo. Embora, o número de dias favorável à vernalização foi pequeno, a RSC demonstrou que a vernalização apresentou efeito positivo sobre o

número de dias ao florescimento na semeadura do cedo, principalmente entre linhagens do cruzamento U71 x Pc68. Por outro lado, a vernalização não apresentou nenhum efeito sobre o florescimento na semeadura do tarde, uma vez que não foram registradas temperaturas de vernalização durante este período (Apêndice 1).

Para a população U8 x U605, não foi possível identificar resposta à vernalização entre os genitores e linhagens recombinantes avaliados neste estudo. A precocidade observada para o genitor U8 no experimento do cedo, indicou que o comprimento do dia não exerce efeito sobre o florescimento neste genótipo. Os resultados concordam com o estudo realizado por Federizzi *et al.*, 1996, onde os autores identificaram um gene maior para insensibilidade ao fotoperíodo no genitor U8. Por outro lado, o genitor U605 não apresentou diferenças no número de dias ao florescimento entre as diferentes épocas de semeadura. Isto indica que os fatores temperatura e comprimento do dia não afetaram o florescimento, uma vez que o requerimento à vernalização não foi satisfeito em nenhuma das épocas de semeadura. É importante lembrar que genótipos com requerimento à vernalização apresentam resposta de sensibilidade ao comprimento do dia somente após o requerimento de vernalização ter sido alcançado (Sorrels & Simmons, 1992).

A partir dos resultados obtidos para a população U8 x U605 neste estudo, não foi possível identificar o fator ambiental de maior importância para o florescimento nesta população. Da mesma forma, não foi possível isolar o efeito da vernalização sobre o florescimento, uma vez que 85% das linhagens apresentaram RSC negativa e apenas 7% das linhagens apresentaram RSC positiva.

Para a população U71 x Pc68, os efeitos de fotoperíodo e vernalização foram melhor discriminados entre os genitores e linhagens recombinantes. O

conhecimento prévio da elevada resposta à vernalização exibida pelo genitor U71 (item 4.1) sugere que o florescimento precoce observado no experimento do cedo (RSC= 2d) foi promovido pela vernalização. Para o genitor Pc68, o florescimento precoce observado no experimento do tarde indicou resposta de sensibilidade ao fotoperíodo, o que confirma os resultados obtidos por Locatelli *et al.*, 2008.

A distribuição de frequência da RSC para as linhagens recombinantes é consistente com os resultados obtidos para os genitores U71 x Pc68. Assim, RSC negativa pode estar associada ao efeito principal de fotoperíodo, enquanto que RSC positiva pode ter sido influenciada em grande parte pela vernalização. A mesma relação foi reportada por Holland *et al.*, 2002, onde os autores avaliaram a resposta à semeadura do cedo para a população de aveia Kanota x Ogle.

As condições ambientais com temperaturas muito altas e comprimento do dia longo (> 15 horas), não permitiram o desenvolvimento adequado das plantas, observado pela baixa estatura, número de folhas, número de afilhos e tamanho de panícula (dados não apresentados). Estas condições produziram efeitos severos na adaptação dos genótipos, especialmente para a população U8 x U605, uma vez que ambos os genitores foram desenvolvidos e adaptados para condições de cultivo do Sul do Brasil, com temperaturas amenas e comprimento do dia intermediário. Por outro lado, o maior nível de adaptação observado para a população U71 x Pc68, possivelmente está associado ao maior valor adaptativo do genitor Pc68, o qual foi desenvolvido para as condições de cultivo do Hemisfério Norte.

Os resultados obtidos neste estudo não permitiram inferir sobre a herança genética da resposta à vernalização em aveia. Isto pode ser justificado pela complexidade do caráter florescimento, pelo grande número de fatores ambientais envolvidos e suas interações. Estes fatores isolados ou em conjunto, devem alterar

o padrão de expressão de genes maiores envolvidos nas rotas de vernalização e fotoperíodo e, conseqüentemente, seus efeitos não puderam ser identificados através da análise fenotípica. Desta forma, as mesmas linhagens avaliadas neste estudo foram submetidas a diferentes tratamentos de vernalização sob condições controladas, conforme descrito a seguir.

4.3 Análise genética da resposta à vernalização em linhagens recombinantes de aveia

Para as linhagens recombinantes das populações U8 x U605 e U71 x Pc68, variação no número de dias ao florescimento (NDF) foi observada nos diferentes tratamentos de vernalização. O NDF para linhagens vernalizadas da população U8 x U605 variou de 25 a 42 dias. No entanto, maior dispersão das linhagens foi observada quando não-vernalizadas, a qual variou de 25 a 58 dias (Figura 7).

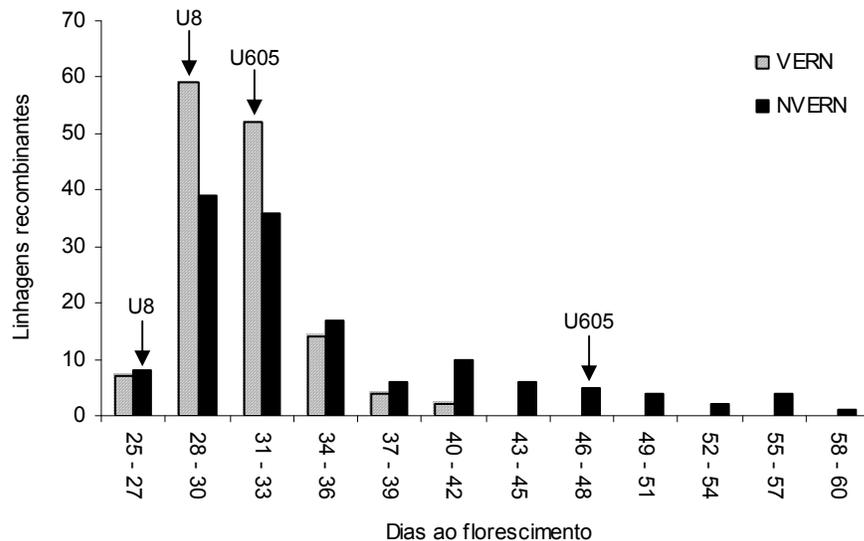


FIGURA 7. Distribuição do número de dias ao florescimento para linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U8 x U605 avaliadas nos tratamentos vernalizado (VERN) e não-vernalizado (NVERN). AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

Os genitores U8 e U605 diferiram no NDF apenas para o tratamento não-vernalizado. Nesta condição, o genitor U8 floresceu com 26 dias e o genitor U605 com 46 dias após o início do experimento em casa de vegetação. Entre as linhagens recombinantes, o florescimento médio de plantas vernalizadas ocorreu com 31 dias e para plantas não-vernalizadas com 35 dias após o início do experimento. O desvio padrão foi estimado em 2,8 e 7,5 dias entre linhagens vernalizadas e não-vernalizadas, respectivamente (Figura 7).

Para as linhagens vernalizadas da população U71 x Pc68, o número de dias ao florescimento variou de 28 a 39 dias, sendo inferior aquela observada para a população U8 x U605. Por outro lado, quando as linhagens não foram submetidas à vernalização, o número de dias ao florescimento variou de 27 a 57 dias. A amplitude de variação para este tratamento foi similar entre as duas populações, porém muito superior ao tratamento vernalizado (Figura 8).

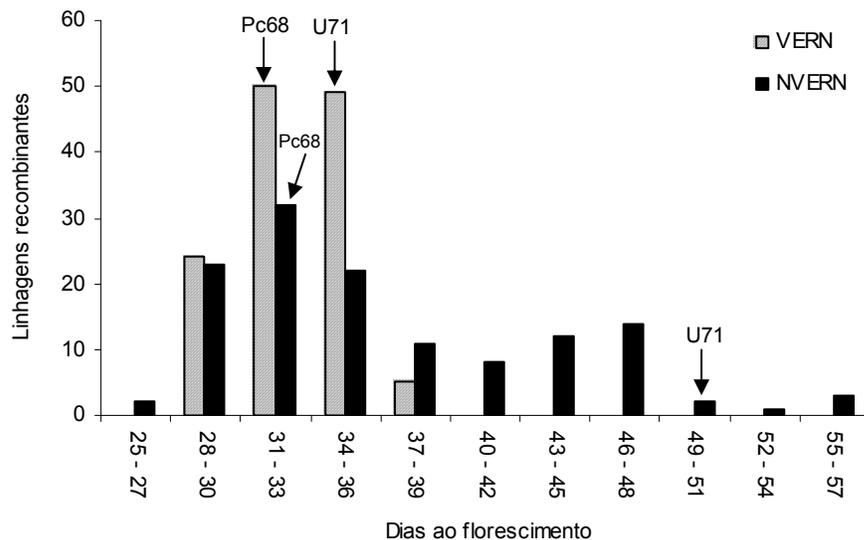


FIGURA 8. Distribuição do número de dias ao florescimento para linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U71 x Pc68 avaliadas nos tratamentos vernalizado (VERN) e não-vernalizado (NVERN). AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

Os genitores U71 e Pc68 também não apresentaram diferenças significativas entre si para o tratamento vernalizado. No entanto, na ausência do tratamento de vernalização, o genitor U71 floresceu aos 49 dias após o início do experimento, enquanto que o genitor Pc68 floresceu 32 dias após o início do experimento. Entre as linhagens recombinantes vernalizadas e não-vernalizadas, o florescimento médio ocorreu aos 33 e 37 dias, respectivamente. Desvio padrão de 2,3 dias foi estimado para o tratamento vernalizado e 6,8 dias para o tratamento não-vernalizado (Figura 8).

Uma ampla variação entre as linhagens de ambas as populações foi determinada para a variável resposta à vernalização (RVERN), a qual foi obtida pela diferença do número de dias ao florescimento entre os tratamentos não-vernalizado e vernalizado. Para as linhagens da população U8 x U605, a resposta à vernalização variou de -5 a 21 dias. Na média, a resposta à vernalização das linhagens foi de quatro dias, com desvio padrão de seis dias (Figura 9).

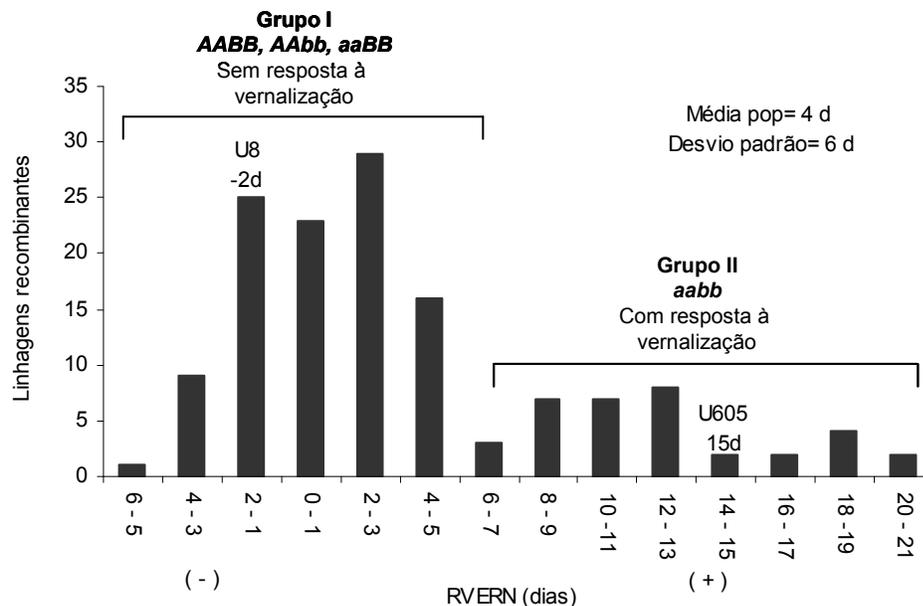


FIGURA 9. Distribuição da resposta à vernalização em linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

O genitor U8 apresentou resposta à vernalização negativa (-2d) e o genitor U605 apresentou resposta à vernalização positiva (15 dias) (Figura 9). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos para os genitores U8 e U605, descritos no item 4.1. Resposta à vernalização negativa exibida pelo genitor U8 neste estudo, também foi reportada por Locatelli *et al.*, 2008. Embora, os mecanismos envolvidos no controle desta resposta sejam desconhecidos, especula-se que a vernalização inibe parcialmente a transcrição de genes de iniciação floral envolvidos na rota do fotoperíodo, como o gene *CO* (*CONSTANS*) e *VRN3*.

Para as linhagens recombinantes da população U71 x Pc68, a resposta à vernalização variou de -5 a 21 dias, tendo como média quatro dias e desvio padrão em 6,3 dias (Figura 10). O genitor U71 antecipou o florescimento em 15 dias quando submetido ao tratamento de vernalização, enquanto que o genitor Pc68 não apresentou diferenças no florescimento para os diferentes tratamentos de vernalização (Figura 10).

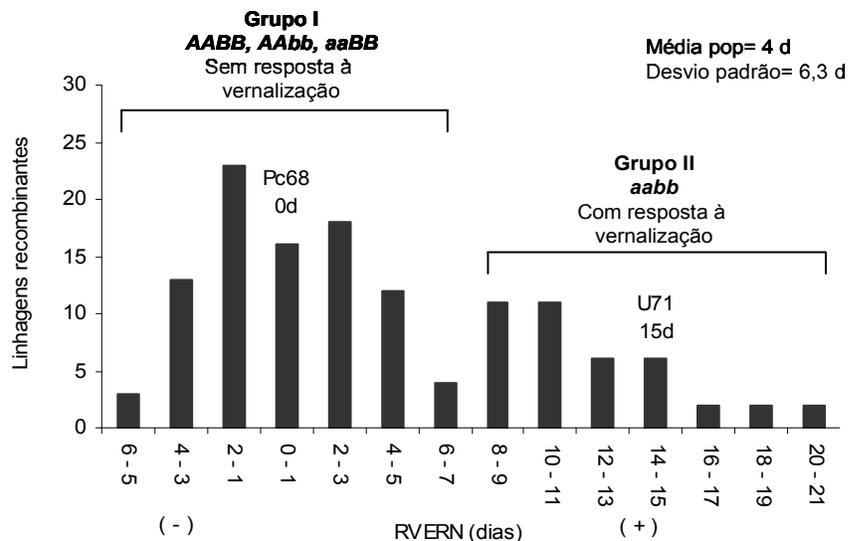


FIGURA 10. Distribuição de frequência da resposta à vernalização (RVERN) em linhagens de aveia derivadas do cruzamento U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

A resposta à vernalização do genitor U71 determinada nesse estudo (15 d) foi inferior a resposta de 26 dias observada no ítem 4.1. Por outro lado, esses resultados foram muito similares aqueles descritos por Locatelli *et al.*, (2008), onde a resposta à vernalização determinada pelos autores foi de 13 dias. Diferenças na temperatura, comprimento do dia e da técnica de vernalização empregada entre os diferentes experimentos, podem estar associados com as diferenças de resposta à vernalização determinadas para o genitor U71.

Para a análise genética, as linhagens recombinantes foram classificadas quanto a resposta à vernalização tendo por base a resposta zero ($RVERN = 0$) \pm um desvio padrão. Para a população U8 x U605, das 138 linhagens avaliadas, 104 linhagens (75,4%) foram consideradas sem resposta e 34 linhagens (24,6%) com resposta à vernalização. A maioria das linhagens dentro de cada grupo de resposta à vernalização, ajustaram-se no intervalo compreendido entre a média dos genitores U8 e U605 \pm um desvio padrão (Figura 9). Para a população U71 x Pc68, das 130 linhagens avaliadas, 90 linhagens (69,2%) foram consideradas sem resposta à vernalização e 40 linhagens (30,8%) com resposta à vernalização. Nesta população, a exemplo da população U8 x U605, as linhagens pertencentes aos diferentes grupos de resposta à vernalização, também ajustaram-se no intervalo entre a média dos genitores U71 e Pc68 \pm um desvio padrão (Figura 10).

Com base na classificação descrita acima, a hipótese de dois genes controlando a resposta à vernalização nas populações U8 x U605 e U71 x Pc68 foi formulada. Com dois genes governando o caráter, é esperado a proporção de segregação de 3:1 (três linhagens sem resposta para uma linhagem com resposta) entre as linhagens avaliadas. O teste de ajustamento do Qui-quadrado para a

população U8 x U605 ($\chi^2_{\text{calculado}} = 0,038$, $P = 0,8454$) demonstrou que a diferença entre as frequências observadas e esperadas não foi significativa. Desta forma, a hipótese de dois genes controlando a resposta à vernalização na população U8 x U605 não foi rejeitada (Tabela 3).

TABELA 3. Teste de ajustamento do qui-quadrado (χ^2) das proporções observadas e esperadas para o modelo de dois genes (3:1) controlando a resposta à vernalização na população U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

População U8 x U605	Vernalização		Total	χ^2	P
	Sem resposta	Com resposta			
	<i>AABB, AAbb, aaBB</i>	<i>aabb</i>			
U8	100%	-			
U605	-	100%			
RILs - Observado	104	34	138		
RILs - Esperado	103	35	138		
				0,038	0,8454

RILs= Linhagens recombinantes endogâmicas

Para a população U71 x Pc68, o teste do qui-quadrado ($\chi^2_{\text{calculado}} = 1,98$, $P = 0,1594$) também não detectou diferença significativa entre as frequências observadas e esperadas. Embora, a população U71 x Pc68 tenha apresentado valor do qui-quadrado superior à população U8 x U605, a hipótese de dois genes governando o caráter na população U71 x Pc68 não foi rejeitada (Tabela 4).

TABELA 4. Teste de ajustamento do qui-quadrado (χ^2) das proporções observadas e esperadas para o modelo de dois genes (3:1) controlando a resposta à vernalização na população U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

População U71 x Pc68	Vernalização		Total	χ^2	P
	Sem resposta	Com resposta			
	<i>AABB, AAbb, aaBB</i>	<i>aabb</i>			
U71	-	100%			
Pc68	100%	-			
RILs - Observado	90	40	130		
RILs - Esperado	97	33	130		
				1,98	0,1594

RILs= Linhagens recombinantes endogâmicas

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a resposta à vernalização em aveia apresenta herança genética simples. Essa descoberta concorda com o modelo onde genes maiores desempenham um papel central na rota de vernalização em trigo, cevada e outras espécies de gramíneas (Laurie *et al.*, 1995; Dubcovsky *et al.*, 1998).

A classificação das linhagens de acordo com a resposta à vernalização produziu dois grupos distintos; grupo I (sem resposta) e grupo II (com resposta), para ambas as populações testadas. No entanto, o grupo II apresentou maior dispersão da resposta à vernalização, para ambas as populações. Diversos fatores podem estar associados a estes resultados, entre eles: i) presença de genes com efeitos menores e/ou modificadores para linhagens que apresentam requerimento à vernalização; ii) a ausência de alelos dominantes do gene *VRN1* pode alterar a expressão de genes envolvidos com o fotoperíodo de maneira diferenciada entre linhagens com resposta à vernalização; iii) locos de vernalização com heterozigose residual, o que dificulta a perfeita separação entre os grupos com e sem resposta à vernalização e; iv) erros de leitura do florescimento, uma vez que a leitura baseou-se em uma medida visual.

A proporção de três linhagens sem resposta para uma linhagem com resposta à vernalização demonstrou efeito de dominância do grupo I sobre o grupo II. Com base nesta classificação, linhagens recombinantes pertencentes ao grupo I devem carregar alelos dominantes em pelo menos um dos locos A e B (*AABB*, *AAbb* e *aaBB*) e linhagens pertencentes ao grupo de classificação II devem possuir alelos recessivos (*aabb*) para ambos os locos (Figuras 9 e 10).

Em trigo, a resposta de sensibilidade ou insensibilidade à vernalização é controlada por alelos presentes em locos com efeitos maiores de vernalização

denominados ***Vrn-A1***, ***Vrn-B1*** e ***Vrn-D1*** (Pugsley, 1972). O alelo dominante ***Vrn-A1*** confere insensibilidade completa à vernalização e é epistático aos alelos dominantes dos locos ***Vrn-B1*** e ***Vrn-D1***. As diferentes combinações de alelos para os locos de vernalização resultam na variação do número de dias ao florescimento em trigo de primavera.

Genótipos de trigo que possuem alelos dominantes para o loco ***Vrn-A1*** serão os primeiros a florescer (super precoces), seguido por genótipos que possuem alelos dominantes dos locos ***Vrn-D1*** e ***Vrn-B1*** (Goncharov, 2004). Alelos dominantes dos genes ***Vrn-A1***, ***Vrn-D1*** e ***Vrn-B1*** apresentam efeito diferencial no número de dias ao florescimento, estatura de plantas e componentes do rendimento (Stelmakh, 1993). Em geral, genótipos carregando dois alelos dominantes em combinação, exibem florescimento precoce e maior potencial de rendimento. Por outro lado, genótipos carregando três alelos dominantes exibem elevada precocidade, porém com baixo potencial de rendimento.

A aveia cultivada no Sul do Brasil, apresenta hábito de crescimento semelhante ao trigo e cevada de primavera. Desta forma, a resposta diferencial à vernalização observada entre diferentes genótipos de aveia também pode estar associada à combinação de diferentes alelos do gene ***VRN1***.

Cultivares de trigo de primavera lançados comercialmente no Canadá foram avaliados quanto a presença de genes de vernalização (Iqbal *et al.*, 2007). Os cultivares comerciais foram comparados com genótipos de trigo, cuja série alélica para os locos de vernalização é conhecida. Os resultados demonstraram que 90% dos cultivares possuem alelos dominantes do loco ***Vrn-A1*** e 40% dos cultivares possuem alelos dominantes para ambos os locos ***Vrn-A1*** e ***Vrn-B1***. Estes resultados podem ser atribuídos à curta estação de crescimento e ausência natural

de vernalização, durante o ciclo vegetativo das plantas, o que favoreceu a seleção de alelos dominantes (**Vrn-A1**) insensíveis à vernalização. O florescimento e a maturação precoce garantem que a colheita seja realizada no momento oportuno, além disso, genes de insensibilidade à vernalização impedem que as plantas sejam afetadas por geadas que podem ocorrer no início do outono, o que afeta negativamente o rendimento e a qualidade de grãos.

Uma vez que genes de vernalização apresentam efeitos diferenciados sobre o florescimento e outras características, isto permite ao melhorista incorporar diferentes alelos de sensibilidade ou insensibilidade à vernalização dentro do seu germoplasma, a fim de gerar variabilidade quanto ao caráter florescimento, sem comprometer o potencial de rendimento de grãos. Assim, a identificação e caracterização molecular dos genes de vernalização em aveia é de grande importância, pois permite que a incorporação destes genes possa ser assistida através de marcadores moleculares.

4.4 Clonagem de genes associados à vernalização em aveia

Sequências de aveia associadas a genes de vernalização foram isoladas a partir da conservação e/ou ortologia existente para genes de vernalização em espécies de gramíneas. Sequências identificadas no banco público de dados moleculares, GenBank representaram sequências genômicas, sequências codificantes completas (cDNA) e sequências codificantes parciais de genes de vernalização de trigo, cevada e azevém. Das 76 sequências identificadas no GenBank, apenas 37 sequências de DNA genômico e codificantes completas (cDNA) foram consideradas neste estudo. Sequências de DNA genômico foram convertidas para sequências codificantes completas. Assim, o alinhamento múltiplo

para os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* foi representado apenas por sequências codificantes, o que permitiu a identificação precisa de regiões genômicas conservadas entre as diferentes sequências e espécies.

Para o gene *VRN1* o alinhamento múltiplo consistiu de 15 sequências, sendo oito sequências derivadas de trigo, quatro sequências de cevada e três sequências de aveia. Para o gene *VRN2*, o alinhamento foi composto por 16 sequências, das quais nove sequências foram derivadas de trigo e sete sequências de cevada. O alinhamento múltiplo para o gene *VRN3* foi composto por seis sequências, sendo três sequências de trigo e três sequências de cevada.

Uma sequência consenso ou de concordância para cada um dos três genes de vernalização foi gerada após o alinhamento múltiplo. A sequência consenso representou regiões codificantes (exônicas) do gene candidato e com elevado nível de conservação entre as sequências e espécies. O número de nucleotídeos da sequência consenso foi similar entre os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3*. Para o gene *VRN1*, a sequência consenso foi constituída por 536 nucleotídeos, para o gene *VRN2* a sequência consenso apresentou 660 nucleotídeos e para o gene *VRN3* a sequência consenso apresentou 535 nucleotídeos (Figura 11).

A sequência consenso obtida para cada gene de vernalização (*VRN1*, *VRN2* e *VRN3*) serviu como modelo para o desenvolvimento de primers, os quais foram utilizados para amplificar sequências de aveia. O desenvolvimento de primers a partir de sequências consenso é uma etapa crucial, uma vez que os primers gerados devem atender a duas exigências principais: i) amplificar o gene alvo ou parte do gene em aveia a partir de um alinhamento de sequências de trigo, cevada e aveia e; ii) amplificar parte do gene em aveia que apresenta variabilidade molecular ou poliformismos genéticos e, assim, permita distinguir genótipos de

aveia com diferentes requerimentos à vernalização. Desta forma, o conhecimento da estrutura do gene de interesse pode ser decisiva, uma vez que os primers devem estar ancorados em regiões codificantes conservadas da sequência consenso. Essa limitação no desenvolvimento de primers baseia-se na pressuposição de que regiões codificantes apresentam maior nível de conservação natural e, portanto, aumentam a probabilidade de amplificação do gene alvo em aveia.

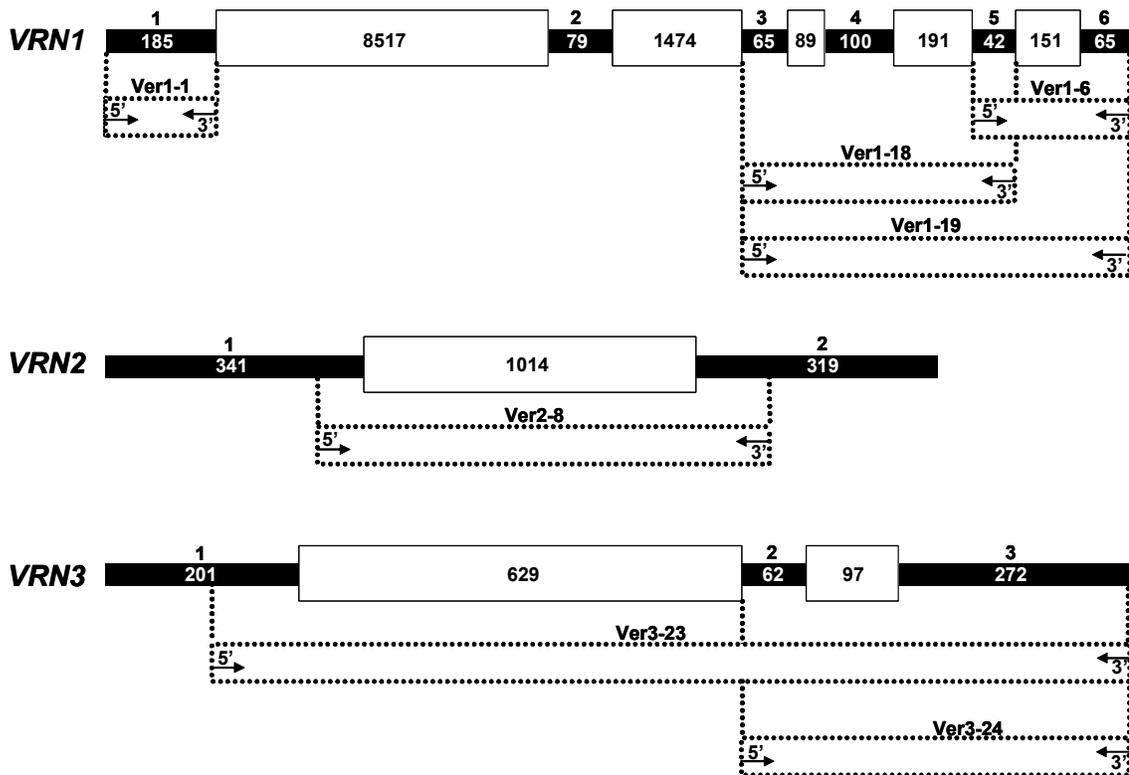


FIGURA 11. Diagrama da sequência consenso para os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3*. Barras pretas representam éxons e caixas brancas representam íntrons. O número de nucleotídeos (pares de bases) de cada éxon e íntron é apresentado dentro de barras e caixas. A localização de ancoragem dos pares de primers que geraram sequências de aveia associadas aos genes de vernalização está apresentada abaixo da sequência consenso de cada gene em caixas pontilhadas. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

Embora, sequências consenso neste estudo representaram regiões codificantes conservadas de genes de vernalização, estas abrigavam regiões não codificantes (íntrons) em posições específicas. O alinhamento da sequência consenso (éxons) com uma sequência de DNA genômico (éxons + íntrons)

correspondente ao gene permitiu identificar o número, tamanho e localização de íntrons presentes na sequência consenso. Esta análise revelou que o número e tamanho de éxons e íntrons variaram amplamente entre os alinhamentos, sendo seis éxons e cinco íntrons para o gene *VRN1*; dois éxons e um íntron para o gene *VRN2* e; três éxons e dois íntrons para o gene *VRN3* (Figura 11).

Para os três genes de vernalização estudados, 22 pares de primers foram testados nos genótipos parentais U8, U605, U71 e Pc68. Destes, 12, 3 e 7 pares de primers representaram os genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3*, respectivamente. Com base no perfil de amplificação e tamanho de fragmentos observados e esperados, nove pares de primers foram selecionados para a etapa de clonagem e sequenciamento. Destes, sete pares de primers amplificaram sequências em aveia com homologia molecular aos genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* de trigo, cevada, azevém e outras espécies de gramíneas (Tabela 5).

TABELA 5. Sequência, orientação e número de bases dos primers que amplificaram sequências em aveia associadas aos genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3*. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

Gene	Primer	Orientação 5' – 3' (Direto)	Bases	Orientação 3' – 5' (Reverso)	Bases
<i>VRN1</i>	Ver1-1	AAGCGGATCGAGAACAAGAT	20	TAGAGCTTTCCTTGGTGGA	20
<i>VRN1</i>	Ver1-6	CCAACCTTATGCACGAATCCA	20	TTCTCCTCCTGCAGTGACCT	20
<i>VRN1</i>	Ver1-18	ACTGAAGGCGAAGGTTGAGA	20	TGGATTTCGTGCATAAGTTGG	20
<i>VRN1</i>	Ver1-19	ACTGAAGGCGAAGGTTGAGA	20	TTCTCCTCCTGCAGTGACCT	20
<i>VRN2</i>	Ver2-8	ATGGCTCACCTAGCTGCAG	19	CGTAAGCTTTTCTGGACTCG	20
<i>VRN3</i>	Ver3-23	GCAATGAGATGAGGACCTTCT	21	CGCTGGCAGTTGAAGTAGAC	20
<i>VRN3</i>	Ver3-24	TGATGGTAGACCCAGATGCTC	21	CGCTGGCAGTTGAAGTAGAC	20

As combinações de primers Ver1-1, Ver1-6, Ver1-18 e Ver1-19 amplificaram sequências de aveia associadas ao gene *VRN1*. O primer Ver1-1 foi ancorado no primeiro éxon do gene *VRN1* de trigo. O primer Ver1-6 foi ancorado no quinto (direto) e sexto (reverso) éxons do gene *VRN1* e abrigou um íntron de 151 nucleotídeos em trigo. O primer Ver1-18 foi ancorado no terceiro (direto) e quinto

(reverso) éxons e abrigou dois íntrons com tamanho de 89 e 191 nucleotídeos, respectivamente. Finalmente, o primer Ver1-19 foi ancorado no terceiro (direto) e sexto (reverso) éxons do gene *VRN1* e abrigou três íntrons com tamanho de 89, 191 e 151 nucleotídeos, respectivamente (Figura 11).

Em aveia, o primer Ver1-1 amplificou sequências com mais de 250 bases. O tamanho destas sequências demonstrou que o primeiro éxon do gene *VRN1* em aveia é maior que o mesmo éxon em trigo, o qual possui 185 bases (Figura 11). As sequências codificantes em aveia geradas pelo primer Ver1-1 apresentaram índices de identidade molecular variando de 84 a 87% com sequências de azevém (Petersen *et al.*, 2004), cevada (Cockram *et al.*, 2007), festuca (Ergon *et al.*, 2006) e trigo (Yan *et al.*, 2004a).

Em aveia, o primer Ver1-6 amplificou sequências com aproximadamente 330 bases, sendo superior à mesma região do gene *VRN1* de trigo, a qual possui 258 bases (Figura 11). A análise de BLAST destas sequências apresentou identidade molecular variando de 76 a 78% com sequências associadas ao gene *VRN1* de trigo (Fu *et al.*, 2005).

O primer Ver1-18 amplificou sequências com aproximadamente 540 bases em aveia, sendo superiores à mesma região do gene *VRN1* em trigo, a qual possui 487 bases (Figura 11). As sequências clonadas de aveia apresentaram índice de identidade molecular de 80% com sequências de trigo (Fu *et al.*, 2005). A análise de BLAST de sequências amplificadas pelos primers Ver1-18 e Ver1-6 não apresentou associação significativa com sequências do gene *VRN1* de cevada e azevém. Por outro lado, sequências amplificadas pelo primer Ver1-18 apresentaram 100% de identidade molecular com o fator de transcrição MADS-box de *Avena sativa* e *Avena*

strigosa (Preston & Kellogg, 2006). O fator de transcrição MADS-box é a proteína codificada pelo gene *VRN1* em cereais (Yan *et al.*, 2003).

O primer Ver1-19 amplificou sequências com aproximadamente 720 bases em aveia. Estas sequências apresentaram tamanho similar à mesma região do gene *VRN1* de trigo (Figura 11). As sequências de aveia apresentaram índice de identidade molecular variando de 75 a 99% com sequências associadas ao fator de transcrição MADS-box de aveia (Preston & Kellogg, 2006) e ao gene *VRN1* de cevada (Cockram *et al.*, 2007; Morrell *et al.*, 2005) e trigo (Fu *et al.*, 2005; von Zitzewitz *et al.*, 2005; Dubcovsky *et al.*, 2006).

Quando uma sequência de aveia amplificada pelo primer Ver1-19 foi alinhada com uma sequência de trigo, regiões genômicas conservadas do gene *VRN1* foram identificadas nestas espécies (Figura 12). A maior uniformidade de alinhamento entre as sequências foi obtida em regiões codificantes (éxons), quando comparada com sequências não codificantes (íntrons) do gene *VRN1* (Figura 12). O elevado nível de conservação em regiões codificantes determinado em aveia e trigo sugerem a existência de ortologia do gene *VRN1* nestas espécies.

Sequências do gene *VRN1* foram isoladas em aveia para os éxons 1, 3, 4, 5 e 6. Por outro lado, não foram isoladas sequências para o segundo éxon do gene *VRN1*. As principais causas atribuídas à não obtenção de sequências para o segundo éxon em aveia foram: a) tamanho reduzido do éxon (79 bases), o qual não permitiu o desenvolvimento de primers com orientação direta e reversa dentro desta região e; b) a localização intermediária do segundo éxon aos íntrons 1 (8517 bases) e 2 (1474 bases) de grande tamanho, o que não permitiu a amplificação indireta através de primers ancorados nos éxons [1 e 2] e [2 e 3].

U8	32	ACTG-AGCGAAGGTTGAGWCAATACAAAAATGTCAAAA GTAAATTAG-AAGTGATTTTGA	89
Trigo	11020	 ACTGAAGGC GAAGTTGAGACAATACAGAAATGTCAAAA GTAAATTTGTAA-CGATTTTGG	11078
U8	90	TTGGTTGCCAGTATGA-TGTATATTCTATTAAGATATATGTGA-T-AGGCT-TACATTCT	145
Trigo	11079	TTGATTGCCAGTAT-ATTGTATACACTCTGAAGATAAATGGGACTGAATTTCTACATCCT	11137
U8	146	GCACCTGCRGG CATCTGATGGGAGAGGATCTCGAATCTTTGAATCTTAAAGAGTTGCAGC	205
Trigo	11138	GCATCTGCAG GCATCTCATGGGAGAGGATCTTGAATCTTTGAATCTCAAGGAGTTGCAGC	11197
U8	206	AACTAGAGCAGCAGCTAGAAAG-TACACTAAAACATATCAGATCCAGAAAGGTA--GAAA	262
Trigo	11198	 AACTGGAGCAGCAGCTGGAAAGCT-CACTGAAACATATCAGATCCAGGAAGGTACTGATT	11256
U8	263	TATGTG-TTT-ATGCTGTGGCAGAATATAT-----CA-AAAACTA-TTGCAGAAAAGC	312
Trigo	11257	 TAAATGATTTGATACAGCAGCACAAATATATAAAAAAGAAAAAAC-ACTTGCAGAGAAGT	11315
U8	313	TCAGTAAAGTACATCTGAATTCAGATTCTAGACTGAGATATCTTACATTATGTGTATGC-	371
Trigo	11316	 TCAGCAAAGTATATCTGAAATCAGATTCTAGACTGAGATGT-TCAAAATATGTATATGCA	11374
U8	372	GTTT-GTCATATGCTCTGT-GTA-TTCAAGAGCTGAC-AA-ATATAAC-TTCCCTGTA-T	424
Trigo	11375	 TTTTAGTCATATGCTCT-TCATAGTTAAAAAATGACTAATTTTTCATTTTGTACT	11433
U8	425	GTGCAG AGCCAGCTTATGCACGAATCCATTTCCGAGCTTCAAAAGAAG GTTAAAG-TGGCA	483
Trigo	11434	 -TGCA GAACCAACTTATGCACGAATCCATTTCTGAGCTTCAAGAAG GT-AAGCTGTCA	11491
U8	484	ACCTTGGCATACTGATTACAGCA-TCGGAACTGGCT-ACCTTGTATGATA-TCTGTAGC	540
Trigo	11492	 ACCTT-GCATACTTATTCCGGTATTC-GAAGTGG-TCAACTTGTCATGA-AGCCT-TAGC	11546
U8	541	TTGTTTCAAGTTTATGGCATCATAGCATGTA--C--GT-A-T-G-C-A-A-GTAC-TCA	588
Trigo	11547	 TTGTTTCAAGATTTGTGACATTATAACATGTATGCAAGTAACTGGTCTACATGCACGTAA	11606
U8	589	CCTCATTACCT CGTTCTTGGTGCAGGAGAGTCACTGCAGGAGGAGAA	636
Trigo	11607	 CCTCATTACAT CGTTCTTGGTGCAGGAGAGTCACTGCAGGAGGAGAA	11654

FIGURA 12. Alinhamento de duas sequências (aveia e trigo) para o gene *VRN1*. A sequência de aveia foi representada pelo genótipo U8 e a sequência de trigo pelo cultivar Triple Dirk D (AY747601). Sequências nucleotídicas em negrito correspondem regiões codificantes (éxons) conservadas em aveia e trigo. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

O alinhamento de sequências amplificadas pelo primer Ver1-19 permitiu identificar o tamanho de éxons e íntrons do gene *VRN1* de aveia. As maiores diferenças foram observadas para os éxons 3 e 6 de aveia, os quais apresentaram menor tamanho (39 e 38 bases) em comparação aos mesmos éxons do gene em trigo, os quais apresentam 65 bases (Figura 11). Pequenas diferenças no número

de nucleotídeos foram determinadas entre os diferentes íntrons de aveia e trigo (Figura 13).

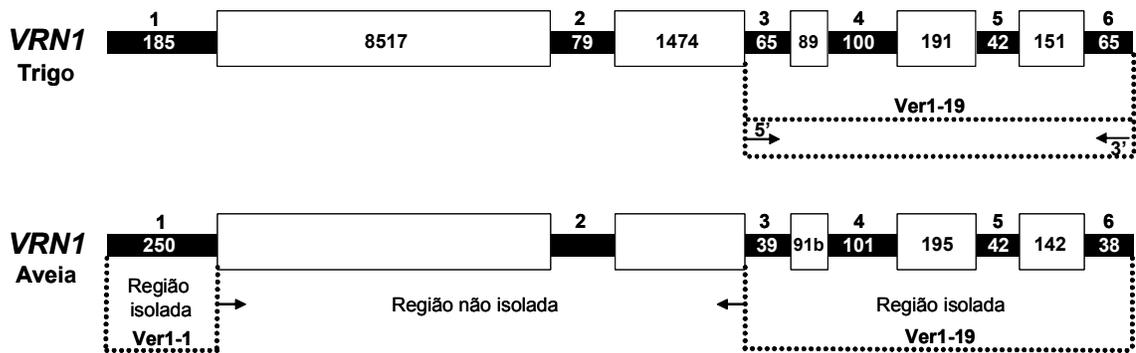


FIGURA 13. Comparação do tamanho de éxons e íntrons do gene *VRN1* em trigo e aveia. Regiões isoladas e não isoladas do gene *VRN1* em aveia foram destacadas em caixas pontilhadas. AAFC-CEF, Ottawa.2007.

O alinhamento de sequências amplificadas pelo primer Ver1-19 para os genótipos de aveia U8, U605, U71, Pc68, Kanota, Ogle e TAMO-301 revelou elevado nível de conservação entre as mesmas (Figura 14). Estes resultados reforçam a hipótese de que a similaridade molecular observada para o gene *VRN1* entre trigo e aveia foi derivada a partir de um ancestral comum e que possivelmente, este gene é ortólogo nestas espécies.

Pequeno número de polimorfismos moleculares foi detectado entre sequências de aveia. Para o terceiro éxon, os genótipos Pc68 e TAMO-301 apresentaram polimorfismo na posição 64, com uma substituição do nucleotídeo A por G (Figura 14a). As demais diferenças observadas para este éxon foram consideradas como erros de amplificação ou erros de sequenciamento. Para o quarto éxon, foi observada variabilidade molecular com relação à sequência padrão (U8) apenas para os genótipos U71 e Pc68 nas posições 176 e 185 (Figura 14b). Para o quinto éxon, variabilidade molecular foi determinada para os genótipos U71 e Pc68 na posição 466, com substituição do nucleotídeo C por T (Figura 14c). Para o

sexto éxon, nenhum polimorfismo molecular foi observado entre os sete genótipos de aveia testados (Figura 14d).

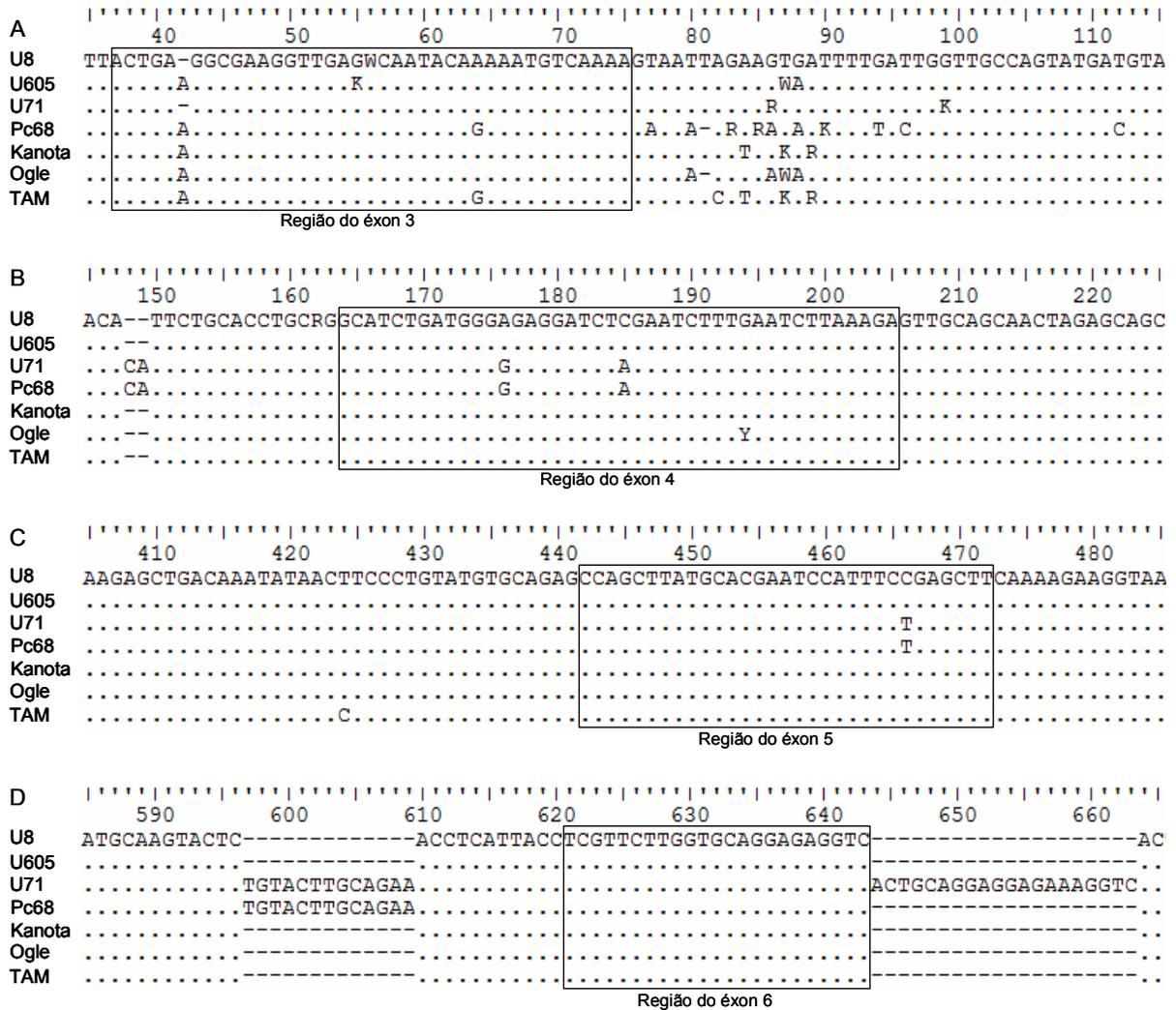


FIGURA 14. Alinhamentos parciais de regiões genômicas conservadas do gene *VRN1* em aveia. Identidade molecular à sequência padrão (U8) é representada por ponto e ausência de alinhamento entre nucleotídeos é representada por hífen. Sequências dentro dos retângulos representam: A) região conservada do terceiro éxon; B) região conservada do quarto éxon; C) região conservada do quinto éxon e; D) região conservada do sexto éxon. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

O alinhamento de duas sequências de aveia amplificadas pelo primer Ver1-19 revelaram que os genitores U71 e Pc68 apresentam maior divergência molecular em relação aos genitores U8 e U605. A divergência molecular foi estimada através da frequência de polimorfismos de base única entre os genitores.

Sequências de aveia associadas ao gene *VRN2* foram amplificadas pelo primer Ver2-8, o qual foi ancorado na região final do primeiro éxon (direto) e região inicial do segundo éxon (reverso) do mesmo gene em trigo e cevada (Figura 11). Em aveia, sequências amplificadas pelo primer Ver2-8 apresentaram tamanho superior a 1200 bases. O tamanho destas sequências sugerem que o gene *VRN2* em aveia abriga um íntron de grande tamanho, assim como ocorre em trigo, o qual apresenta 1014 bases (Figura 11). Desta forma, apenas uma pequena porção das sequências de aveia representaram regiões codificantes do gene *VRN2*.

O alinhamento das sequências de aveia não apresentou associação direta com sequências do gene *VRN2* de trigo e cevada, disponíveis no GenBank. Entretanto, as sequências de aveia apresentaram 85% de homologia com uma proteína que possui motivo *zinc-finger* e domínio CCT2 e CCT1 (ZCCT2 e ZCCT1) de *Triticum monococcum* (Yan *et al.*, 2004b) (Figura 15). As proteínas ZCCT2 e ZCCT1 são componentes do gene *VRN2* em trigo cultivado e cevada.

Através da análise de uma sequência de aveia com uma sequência de *Triticum monococcum*, foi possível identificar uma pequena região genômica de 21 bases conservada entre estas espécies (Figura 15a) e também entre os genótipos de aveia U8 e U605 (Figura 15b). A sequência conservada em aveia CGAGTCCAGAAAAGCTTACGC está localizada na região final do primeiro éxon do gene *VRN2* e apresentou 100% de homologia com sequências do gene *VRN2* de *Triticum monococcum* e cevada (Szucs *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2004b).

Apesar da homologia da sequência de aveia CGAGTCCAGAAAAGCTTACGC com o gene *VRN2* de trigo e cevada, esta sequência representou uma região muito pequena do gene. Além disso, o baixo nível de homologia entre as sequências de

aveia com sequências de trigo e cevada disponíveis no GenBank, sugerem que o gene *VRN2* não está presente no germoplasma brasileiro de aveia.

A				
U8	25	CGAGTCCAGAAAAGCTTACGC	45	
Trigo	596	CGAGTCCAGAAAAGCTTACGC	616	
B				
U8	25	CGAGTCCAGAAAAGCTTACGC	45	
U605	26	CGAGTCCAGAAAAGCTTACGC	46	

FIGURA 15. Alinhamento de sequências mostrando região conservada do gene *VRN2*. A) alinhamento de sequências do genitor U8 e trigo (acesso AY485964); B) alinhamento de sequências dos genitores U8 e U605. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

Alelos dominantes do gene *VRN2* em trigo e cevada conferem fenótipo com hábito de crescimento de inverno e com requerimento obrigatório à vernalização (Yan *et al.*, 2004b). Por outro lado, a variação no florescimento em resposta à vernalização em trigo com hábito de crescimento de primavera ocorre em função de diferentes combinações de alelos do gene *VRN1* (Iqbal *et al.*, 2007). Embora, genótipos de aveia cultivados na região Sul do Brasil apresentam resposta à vernalização, o requerimento à vernalização não é obrigatório e o padrão de crescimento da aveia assemelha-se ao trigo de primavera. Desta forma, o controle da resposta à vernalização exibida por genótipos brasileiros de aveia deve resultar da combinação de diferentes alelos do gene *VRN1* e não pela presença de alelos funcionais do gene *VRN2*.

Sequências de aveia amplificadas pelo primer Ver2-8 apresentaram o máximo escore de identidade molecular à um retrotransposon (OARE-1) de *Avena sativa* (Kimura *et al.*, 2001). A partir desta descoberta, especula-se que a perda de função do gene *VRN2* em aveia pode ter ocorrido através da inserção de um

retrotransposon na região do primeiro íntron do gene durante a evolução desta espécie.

Sequências associadas ao gene *VRN3* foram isoladas dos genótipos de aveia U8, U605, U71 e Pc68, a partir dos primers Ver3-23 e Ver3-24. O primer Ver3-23 foi ancorado no primeiro éxon (direto) e terceiro éxon (reverso) do gene *VRN3* e amplificou sequências com aproximadamente 700 bases em aveia. O tamanho das sequências amplificadas em aveia mostraram-se inferiores à mesma região do gene em trigo (Figura 11). As sequências de aveia amplificadas pelo primer Ver3-23 demonstraram índices de identidade molecular variando de 82 a 96% com sequências do gene *VRN3* de azevém (King *et al.*, 2006), trigo (Yan *et al.*, 2006) e cevada (Yan *et al.*, 2006).

O primer Ver3-24 foi ancorado no segundo éxon (direto) e terceiro éxon (reverso) do gene *VRN3*. Sequências com aproximadamente 510 bases foram amplificadas em aveia, sendo superiores à mesma região do gene em trigo (Figura 11). As sequências de aveia exibiram elevado nível de identidade molecular (85 a 100%) com sequências do gene *VRN3* de azevém (King *et al.*, 2006), trigo (Bonnin *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2006) e cevada (Faure *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2006).

As sequências de aveia amplificadas pelos primers Ver3-23 e Ver3-24 também apresentaram elevada homologia (90%) ao gene *Hd3a* (*Heading date3a*) do arroz (Hayama *et al.*, 2003). O gene *VRN3* de trigo e cevada é considerado ortólogo ao gene *Hd3a* do arroz. Tanto *VRN3*, como *Hd3a* são genes promotores do florescimento e apresentam efeito regulatório em resposta à vernalização e comprimento do dia (Trevaskis *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2006).

O alinhamento de uma sequência de aveia amplificada pelo primer Ver3-24, com uma sequência completa do gene *VRN3* de trigo, permitiu identificar o tamanho dos éxons 2 e 3 e do íntron 2 do gene *VRN3* de aveia. Os éxons 2 (39 bases) e 3 (260 bases) de aveia apresentaram tamanho menor aos mesmos éxons em trigo, os quais possuem 62 e 272 bases, respectivamente. Por outro lado, o segundo íntron em aveia apresentou 145 bases, com tamanho maior em comparação ao mesmo íntron presente em trigo, com 97 bases (Figura 11).

O alinhamento de sequências amplificadas pelo primer Ver3-24 para os genótipos de aveia U8, U605, U71 e Pc68 mostrou elevado nível de homologia entre as sequências de aveia. As sequências de aveia recuperaram as sequências nucleotídicas correspondentes aos éxons 2 e 3 do gene *VRN3* de trigo (Figura 16).

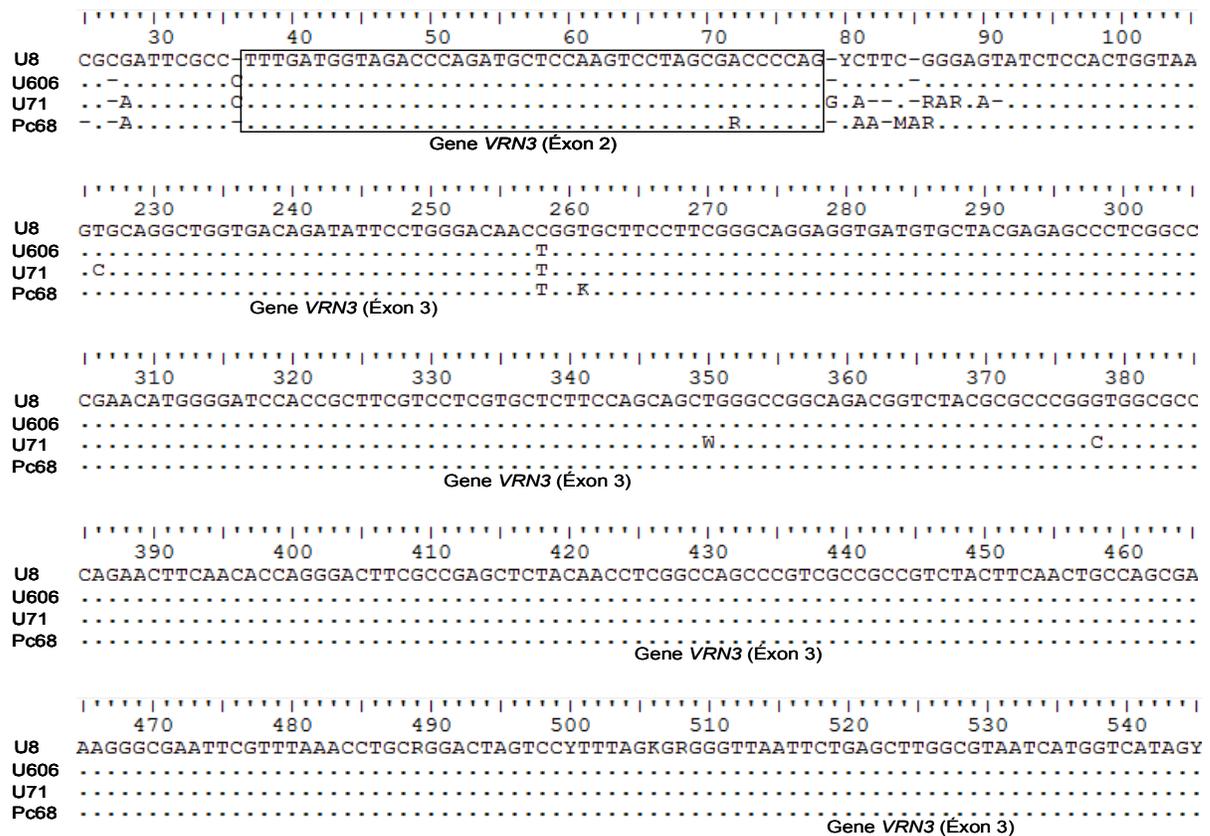


FIGURA 16. Alinhamentos parciais de regiões genômicas conservadas do gene *VRN3* em aveia. Identidade molecular à sequência padrão (U8) é representada por ponto e ausência de alinhamento entre nucleotídeos representada por hífen. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

O elevado nível de homologia entre as sequências de aveia com sequências associadas ao gene *VRN3* de trigo, cevada e avevém e ao gene *Hd3-a* do arroz, fornecem fortes evidências da conservação deste gene em aveia e, portanto, apresenta ortologia entre estas espécies.

As sequências codificantes de aveia que apresentaram identidade molecular aos genes *VRN1* e *VRN3* serão submetidas ao banco público de dados moleculares, GenBank. Estas sequências representam sequências de aveia para genes de grande efeito sobre o florescimento. Além disso, os resultados deste estudo contribuirão significativamente para o mapeamento dos genes *VRN1* e *VRN3* em aveia e na identificação de marcadores moleculares ligados a estes genes. O mapeamento do gene *VRN3* em aveia e maiores implicações destes resultados ao melhoramento genético de aveia serão apresentados na sequência deste trabalho.

4.5 Análise de arranjos de diversidade – DArT

Polimorfismos genéticos em linhagens recombinantes de aveia foram detectados em representações genômicas através de hibridizações em microarranjos. Os polimorfismos foram detectados pela presença versus ausência de fragmentos individuais de DNA nas representações genômicas geradas a partir de amostras de DNA de diferentes genótipos de aveia. Um grande número de polimorfismos e/ou marcadores DArT foram determinados pela análise de arranjos de diversidade em ambas as populações de aveia analisadas neste estudo.

Para a população U8 x U605, das 150 linhagens recombinantes de aveia analisadas, 265 marcadores DArT foram obtidos (Figura 17). Dos 265 marcadores, 21 não apresentaram localização genômica conhecida à nenhum dos grupos de

ligação. A falta de ligação desses marcadores pode ser justificada através de dois fatores principais: i) a construção do mapa genético foi realizada com um valor de LOD= 7,0, o qual não permitiu o agrupamento de marcadores com baixa probabilidade de ligação genética aos grupos de ligação formados e; ii) o tamanho e a elevada complexidade do genoma poliplóide da aveia não permitiram identificar ligação genética de todos os marcadores identificados pela análise de DArT.

O número de marcadores moleculares distribuídos em cada grupo de ligação variou de dois marcadores até 29 marcadores para o grupo de ligação 2. A distância genética (cM) compreendida para cada grupo de ligação variou de zero cM para os grupos de ligação 25 e 31 até 61 cM para o grupo de ligação 2 (Figura 17).

O mapa genético completo desenvolvido para a população de aveia U8 x U605, envolvendo 244 marcadores moleculares cobriu uma região genômica de 621 cM entre os 31 grupos de ligação. Os maiores grupos de ligação formados foram: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11 e 14, os quais cobriram uma região de 400 cM e corresponderam à 64,4% do mapa.

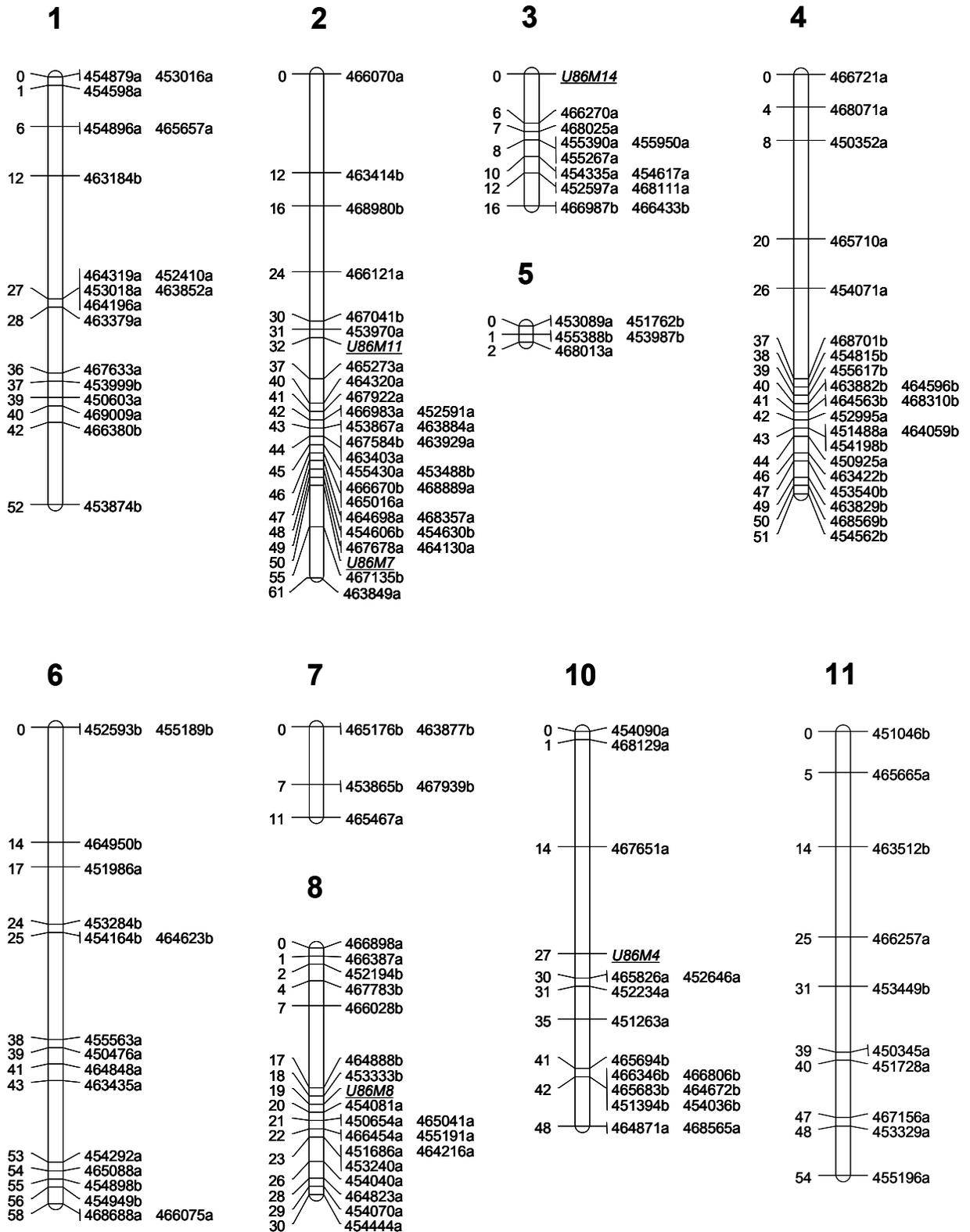
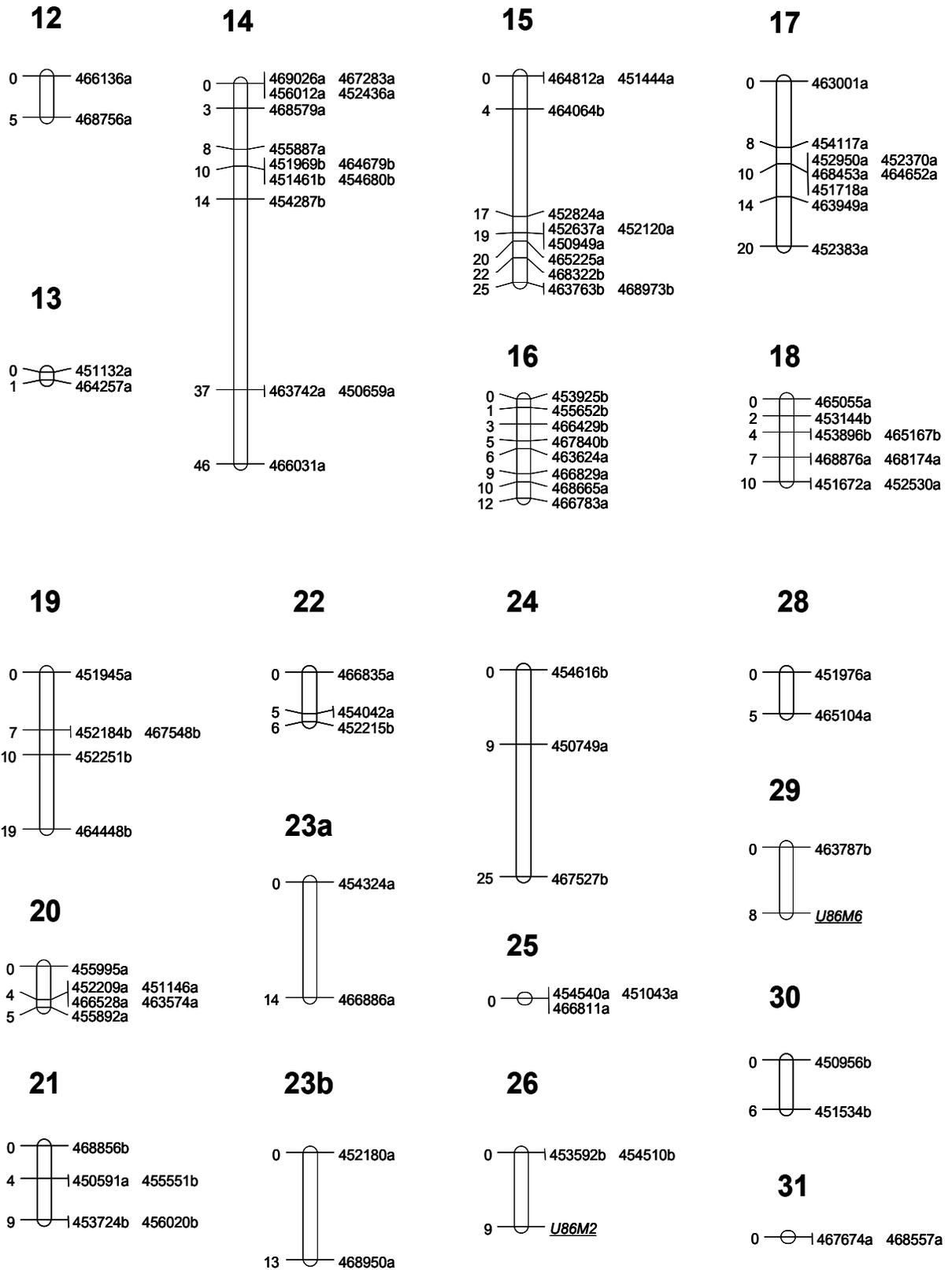


FIGURA 17. Mapa genético de ligação baseado em marcadores moleculares DArT para o cruzamento de aveia entre os genitores U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.



continuação FIGURA 17. Mapa genético de ligação baseado em marcadores moleculares DArT para o cruzamento de aveia entre os genitores U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

Para a população U71 x Pc68, 313 marcadores foram identificados entre as 128 linhagens recombinantes analisadas (Figura 18). Dos 313 marcadores, 26 não apresentaram localização conhecida à nenhum dos grupos de ligação no mapa genético da população U71 x Pc68. A ausência de ligação destes marcadores deve apresentar as mesmas causas descritas acima para U8 x U605.

O número de marcadores moleculares distribuídos em cada grupo de ligação variou de dois marcadores até 42 marcadores moleculares para o grupo de ligação 1. A distância genética (cM) abrangida por cada grupo de ligação variou de zero cM para os grupos de ligação 3 e 8 até 81 cM para o grupo de ligação 9 (Figura 18). O mapa genético gerado para a população U71 x Pc68 cobriu uma região genômica de 825 cM. Os maiores grupos de ligação formados foram: 1, 2, 4, 9, 14, 16, 19 e 20, abrangendo 501 cM e corresponderam a 60,7% do mapa genético.

A análise de arranjos de diversidade revelou que a população U71 x Pc68 apresentou 43 marcadores moleculares a mais e uma distância genética superior em 204 cM, em relação ao número de marcadores e distância genética obtida para a população U8 x U605. Estas diferenças sugerem a existência de uma base genética mais ampla, com maior diversidade molecular entre os genitores U71 e Pc68, quando comparada aos genitores U8 e U605.

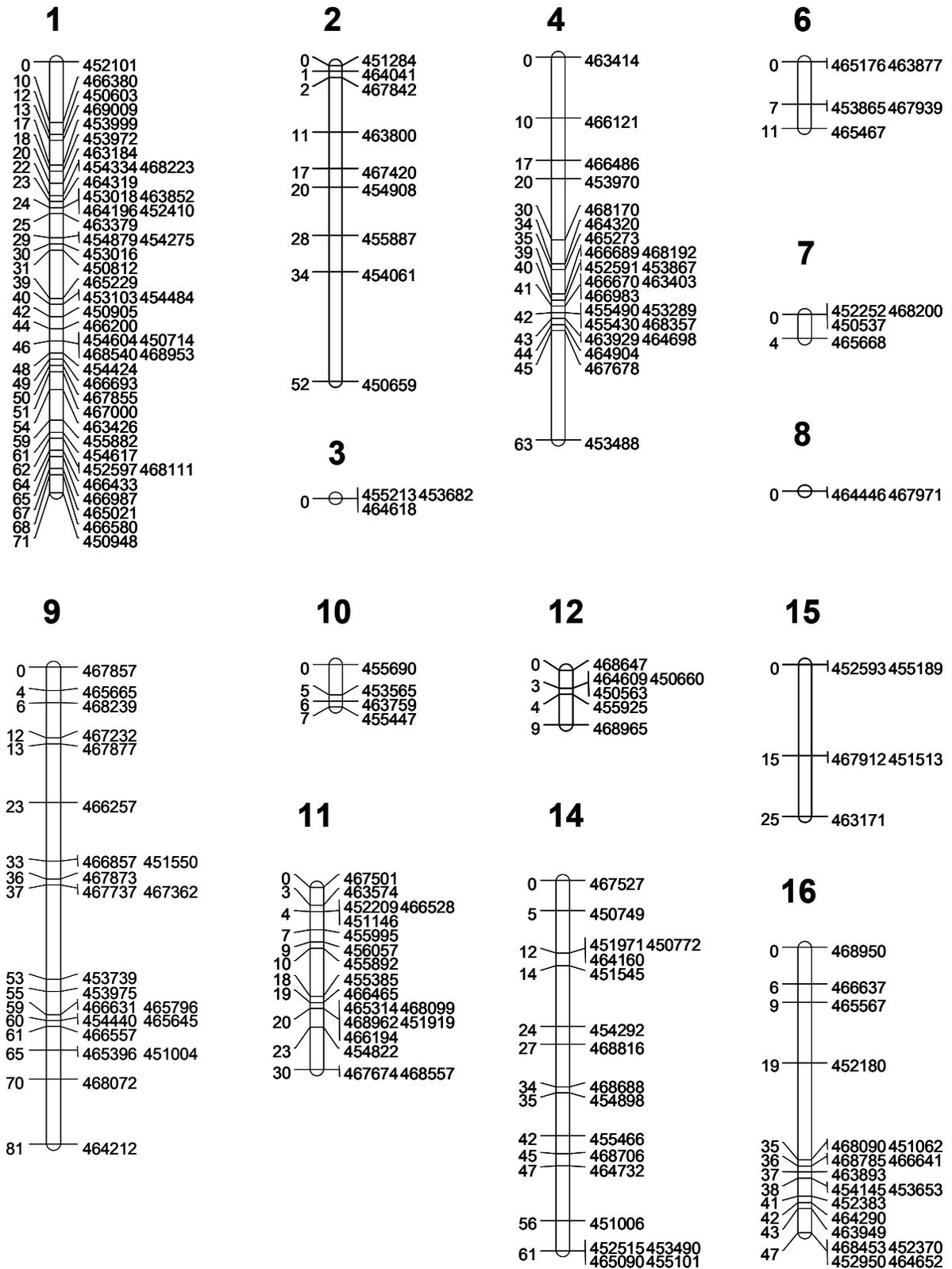
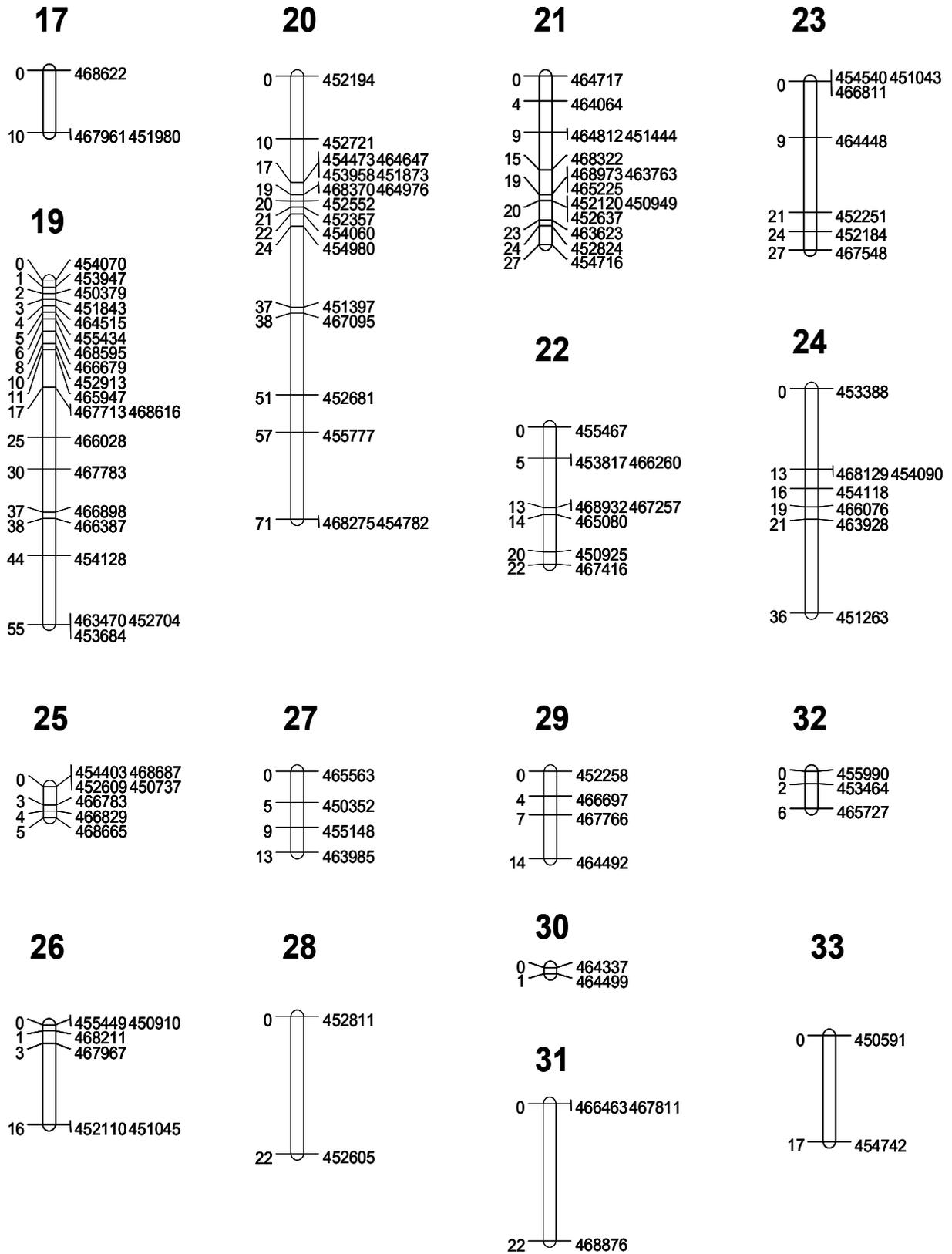


FIGURA 18. Mapa genético de ligação baseado em marcadores moleculares DArT para o cruzamento de aveia entre os genitores U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.



continuação FIGURA 18. Mapa genético de ligação baseado em marcadores moleculares DArT para o cruzamento de aveia entre os genitores U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

A análise de arranjos de diversidade (DArT) também foi realizada para a população de aveia Kanota x Ogle. Entre as 80 linhagens analisadas nesta população, 1010 marcadores moleculares foram detectados, os quais cobriram uma região genômica de aproximadamente 2.000 cM (Tinker *et al.*, dados não publicados). Os resultados em K x O, embora ainda preliminares foram consistentes com o atual mapa molecular, com base em marcadores RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), SSR (simple sequence repeats) e SCAR (*sequence characterized amplified region*), o qual apresenta uma região genômica de 1890 cM (Wight *et al.*, 2003).

O mapeamento molecular através da tecnologia de DArT também foi realizado em trigo e cevada, espécies com tamanho e complexidade do genoma similar ao da aveia. Em trigo hexaplóide, o mapeamento molecular foi realizado a partir de 90 linhagens derivadas do cruzamento entre os genitores Cranbrook e Halberd. O mapa genético gerado cobriu uma região genômica de 2.383 cM (Akbari *et al.*, 2006), o qual apresentou tamanho muito similar ao mapa genético gerado a partir de marcadores RFLP, AFLP e SSR para a mesma população (Lehmensiek *et al.*, 2005). Em cevada o mapeamento foi realizado a partir de 94 linhagens do cruzamento entre os genitores Steptoe e Morex, o qual cobriu uma região de 1.173 cM (Wenzl *et al.*, 2004). O mapa genético desenvolvido a partir de marcadores DArT em cevada apresentou elevada associação com o mapa gerado para a mesma população a partir de marcadores RFLP, AFLP e SSR, o qual abriga uma região genômica de 1.195 cM (Kleinhofs *et al.*, 1993).

Os resultados deste estudo demonstram que a tecnologia de arranjos de diversidade (DArT) pode ser usada de maneira eficiente na genotipagem de

espécies poliplóides que possuem um genoma extenso e complexo, como a aveia. A qualidade dos dados gerada em aveia foi similar a qualidade dos dados previamente obtida para arroz (Jaccoud *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2006), cevada (Wenzl *et al.*, 2004; Hearnden *et al.*, 2007), *Arabidopsis* (Wittenberg *et al.*, 2005), mandioca (Xia *et al.*, 2005) e trigo (Akbari *et al.*, 2006).

Diversas vantagens estão associadas à tecnologia de DArT para a obtenção de marcadores moleculares em aveia, quando comparada a outros tipos de marcadores. As vantagens estão associadas à dois fatores principais: i) a tecnologia não é dependente do conhecimento prévio de sequências do genoma, como ocorre com os marcadores do tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) e; ii) a identificação dos polimorfismos não é dependente de géis de eletroforese como para os marcadores do tipo AFLP e SSR. Desta forma, a tecnologia de DArT permite a construção de mapas genéticos com média à alta saturação de marcadores de maneira rápida, eficiente e com baixo custo (Jaccoud *et al.*, 2001).

A disponibilidade de marcadores moleculares em aveia é de grande importância aos programas de melhoramento genético. Estes marcadores podem ser empregados na genotipagem do germoplasma, identificação de QTLs (*quantitative trait loci*), seleção assistida por marcadores moleculares, introgressão de genes ou regiões genômicas via marcadores DArT e mapeamento molecular de genes a partir de mapas genéticos pré-existentes.

Nas seções que seguem este trabalho, os mapas genéticos desenvolvidos através de marcadores DArT serão aplicados em dois estudos associados à vernalização em aveia. O primeiro estudo descreve o mapeamento do gene de vernalização *VRN3* nas populações U8 x U605, U71 x Pc68 e K x O. No segundo

estudo, a identificação de marcadores moleculares DArT ligados a QTLs que afetam a resposta à vernalização nas populações de aveia U8 x U605 e U71 x Pc68.

4.6 Mapeamento molecular do gene *VRN3* em aveia

Os primers desenvolvidos para amplificar sequências codificantes de aveia associadas aos genes *VRN1*, *VRN2* e *VRN3* na etapa de clonagem e sequenciamento, também foram analisados quanto à presença de polimorfismos moleculares em aveia. Das 22 combinações de primers testadas, apenas os primers Ver3-23 e Ver3-24 (Figura 11) gerados a partir do alinhamento múltiplo de sequências do gene *VRN3* demonstraram-se polimórficos em aveia. A ausência de polimorfismos pelos primers desenvolvidos para *VRN1* e *VRN2*, não permitiu o mapeamento direto dos mesmos neste estudo.

Os polimorfismos moleculares amplificados pelos primers Ver3-23 e Ver3-24 foram inicialmente detectados nos genótipos parentais U8, U605, U71, Pc68, Kanota e Ogle. A validação dos polimorfismos observados nestes genótipos foi realizada através de testes preliminares de amplificação com os primers Ver3-23 e Ver3-24, em uma amostra de 20 linhagens recombinantes de cada população. Estes testes indicaram que o primer Ver3-23 permitia uma melhor discriminação dos polimorfismos entre os genitores e linhagens recombinantes analisadas, em comparação ao primer Ver3-24.

A Figura 19 ilustra o padrão de amplificação gerado pelo primer Ver3-23 para os genitores U71 x Pc68 e oito linhagens recombinantes derivadas deste cruzamento. O mesmo padrão de amplificação foi obtido para as populações U8 x U605 e K x O. Desta forma, o primer Ver3-23 foi empregado no mapeamento do gene *VRN3* nas populações de mapeamento U8 x U605, U71 x Pc68 e K x O.

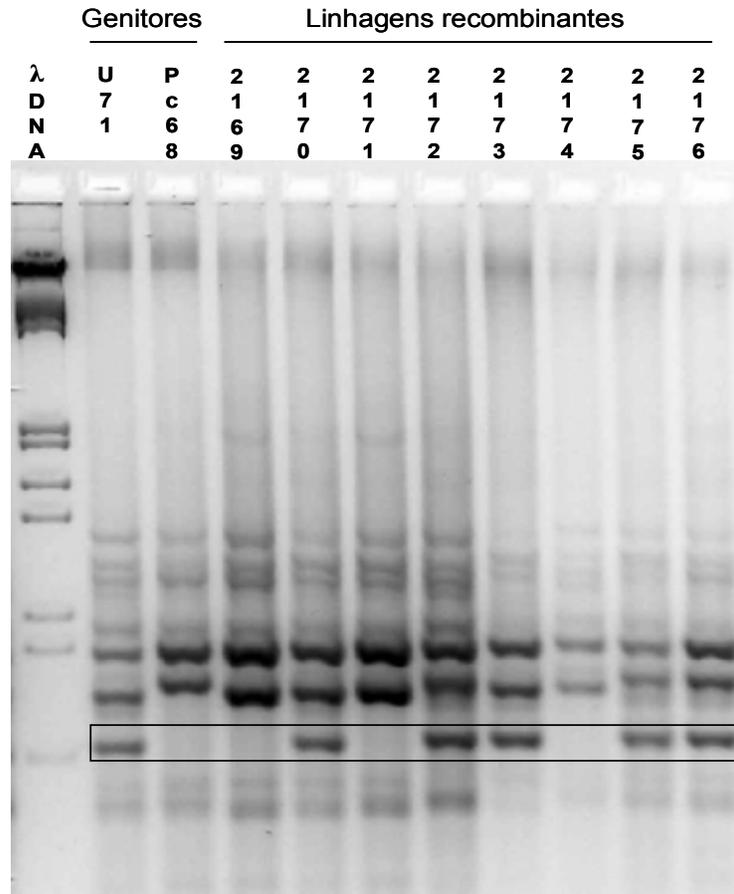


FIGURA 19. Polimorfismos moleculares observados para os genitores U71 e Pc68 e oito linhagens recombinantes derivadas deste cruzamento. Os polimorfismos foram gerados pelo primer Ver3-23. As bandas polimórficas localizadas na porção inferior do gel de agarose e destacadas dentro da caixa retangular foram analisadas e empregadas para o mapeamento do gene *VRN3* em aveia. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

Para a população U8 x U605, o mapeamento molecular do gene *VRN3* foi realizado em 148 linhagens recombinantes. Destas, 56 linhagens (38%) apresentaram escore 3, igual ao genitor U605 e 92 linhagens (62%) apresentaram banda dominante e receberam escore 5, igual ao genitor U8. A análise de segregação Mendeliana realizada através do teste de Qui-quadrado indicou que os resultados não seguiram a proporção 1:1 esperada para linhagens recombinantes em homozigose ($\chi^2 = 8,76$, $P = 0,0031$).

Para a população de mapeamento U71 x Pc68, o gene *VRN3* foi mapeado a partir de 124 linhagens recombinantes, sendo que 42 linhagens (34%)

apresentaram escore 3, igual ao genitor Pc68 e 82 linhagens (66%) apresentaram escore 5, igual ao genitor U71. A análise de segregação Mendeliana, da mesma forma que para a população U8 x U605 indicou que a proporção de segregação 1:1 esperada entre as linhagens não pode ser aceita ($\chi^2= 12,9$, $P= 0,0003$).

Para a população K x O, o mapeamento molecular do gene *VRN3* foi realizado a partir de 107 linhagens recombinantes. Destas, 45 linhagens (42%) apresentaram escore 3, igual ao genitor Ogle e 62 linhagens (58%) apresentaram escore 5, igual ao genitor Kanota. O teste de segregação Mendeliana, ao contrário das populações U8 x U605 e U71 x Pc68 permitiu aceitar a proporção de segregação de 1:1 entre as linhagens analisadas ($\chi^2= 2,70$, $P= 0,1003$).

Os testes de segregação realizados acima indicaram distorção de segregação do loco *VRN3* para as populações U8 x U605 e U71 x Pc68. No entanto, a diferença de segregação observada pode estar associada à presença de locos do gene *VRN3* em heterozigose entre as linhagens recombinantes. Como as linhagens foram derivadas da geração F5 através do método SSD, a frequência de aproximadamente 6% de heterozigotos é esperada em cada população. A partir desta pressuposição, a hipótese de 56:44 em favor do loco dominante foi testada. Para a população U8 x U605 a hipótese foi aceita ($\chi^2= 1,94$, $P= 0,1637$), porém para a população U71 x Pc68 a hipótese foi rejeitada ($\chi^2= 5,52$, $P= 0,0188$). As causas da maior distorção de segregação determinada na população U71 x Pc68 podem estar associadas à seleção indireta para o genoma do genitor mais adaptado (U71) e eliminação de material muito tardio durante o desenvolvimento das linhagens. Mesmo assim, os resultados da análise de polimorfismos moleculares detectados nestas populações foram empregados no mapeamento molecular do gene *VRN3*.

Os resultados de polimorfismos do gene *VRN3* foram integrados aos resultados da análise de arranjos de diversidade (DArT) realizada para cada uma das três populações. Para a população U8 x U605, o gene *VRN3* foi mapeado no grupo de ligação 11, 10 cM distal ao marcador DArT 466257a e 5 cM proximal ao marcador DArT 463512b (Figura 20). Para a população U71 x Pc68, o gene *VRN3* foi mapeado no grupo de ligação 9, 3 cM distal ao marcador DArT 467232 e 3 cM proximal ao marcador DArT 468239 (Figura 20). Finalmente, para a população K x O, o gene *VRN3* foi mapeado no grupo de ligação 6, 6 cM distal ao marcador DArT 453755 e 1 cM proximal ao marcador DArT 463512 (Figura 20).

Marcadores moleculares em comum foram identificados entre os grupos de ligação que carregam o gene *VRN3* nas diferentes populações, através do mapeamento comparativo. O grupo de ligação 11, onde o gene *VRN3* foi mapeado na população U8 x U605 possui os marcadores DArT 465665 e 466257a em comum ao grupo de ligação 9, o qual contém o gene *VRN3* na população U71 x Pc68. A distância genética do gene *VRN3* aos marcadores 465665 e 466257a para o grupo de ligação 11 (U8 x U605) foi de 12 e 10 cM e para o grupo de ligação 9 (U71 x Pc68) foi de 5 e 14 cM, respectivamente (Figura 20).

Na comparação do grupo de ligação 9 da população U71 x Pc68 com o grupo de ligação 6 de K x O, três marcadores DArT em comum foram identificados; 453565, 455447 e 467857. Os marcadores 453565 e 455447 foram localizados à uma distância genética superior a 20 cM do gene *VRN3* em ambos os grupos de ligação. Já o marcador 467857 está localizado próximo ao gene *VRN3*, com distância de 9 e 12 cM entre os grupos 9 e 7, respectivamente (Figura 20). O marcador 463512 é comum aos grupos de ligação 11 (U8 x U605) e 6 (K x O), localizado 5 e 1 cM distal ao gene *VRN3*, respectivamente (Figura 20). Nas três

populações, o gene *VRN3* foi mapeado em regiões cromossômicas colineares correspondendo ao grupo de ligação 6 do mapa genético de ligação da população K x O (Wight *et al.*, 2003).

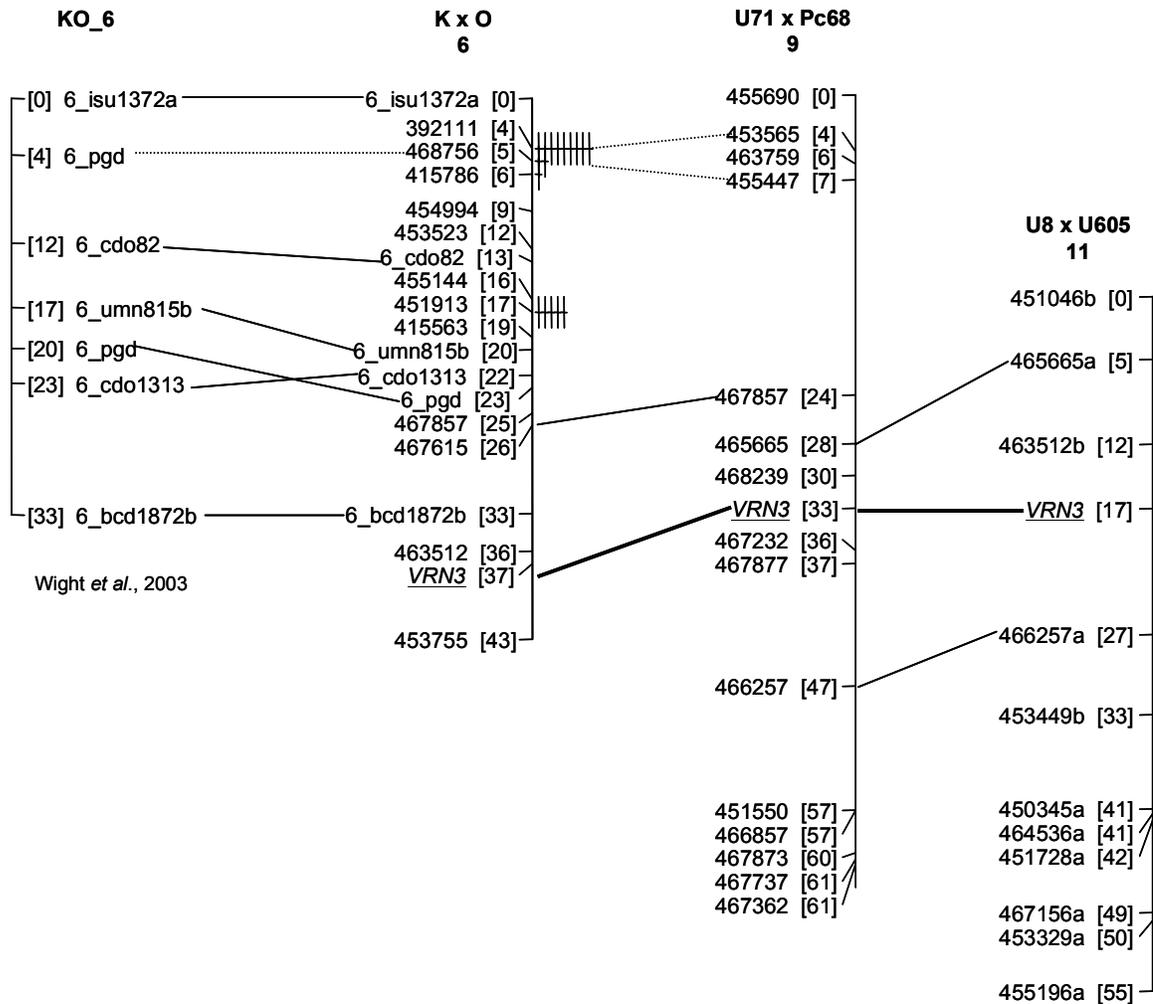


FIGURA 20. Mapeamento molecular do gene *VRN3* em aveia. O gene *VRN3* foi mapeado nos grupos de ligação 11, 9 e 6 das populações U8 x U605, U71 x Pc68 e K x O, respectivamente, usando marcadores moleculares DArT. O mapa de ligação comparativo demonstra que o gene *VRN3* está localizado em regiões colineares ao grupo de ligação 6 de K x O. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

Os resultados do mapeamento molecular sugerem que o gene *VRN3* está localizado em regiões cromossômicas homólogas e/ou colineares nas populações U8 x U605, U71 x Pc68 e K x O. Os resultados também indicam que o mesmo loco

gênico foi mapeado nas três populações, mesmo com a ocorrência de distorção de segregação nas populações brasileiras de aveia U8 x U605 e U71 x Pc68.

O gene *VRN3* também foi recentemente mapeado em trigo e cevada. Em trigo, este gene está localizado no braço curto do cromossomo 7B, enquanto que em cevada, o gene *VRN3* está localizado no braço curto do cromossomo 7H (Yan *et al.*, 2006). Baseado na colinearidade existente entre cromossomos de trigo e cevada (Dubcovsky *et al.*, 1996) e a ligação do gene *VRN3* nestas espécies com marcadores moleculares em comum localizados no grupo homeólogo 7, os genes *VRN3* de trigo e cevada são considerados ortólogos (Yan *et al.*, 2006). A localização do gene *VRN3* em trigo e cevada, também é colinear à região genômica do arroz, onde o gene *Hd3a* foi mapeado. O gene *Hd3a* é responsável por diferenças significativas no florescimento em arroz e é ortólogo ao gene *VRN3* de trigo e cevada (Yan *et al.*, 2006). Em trigo e cevada, o gene *VRN3* é um promotor do florescimento, o qual acelera o desenvolvimento do ápice reprodutivo em condições de fotoperíodo de dias longos (Yan *et al.*, 2006; Faure *et al.*, 2007).

Os resultados da análise de polimorfismos do gene *VRN3* também foram comparados com os resultados do estudo de vernalização em casa de vegetação (item 4.3), a fim de estimar o efeito do gene *VRN3* sobre a resposta à vernalização. A análise de correlações demonstrou baixa associação entre os componentes analisados, para ambas as populações U8 x U605 e U71 x Pc68. Coeficiente de correlação significativo ($r = 0,23$) foi estimado entre polimorfismos moleculares e o tratamento vernalizado para a população U8 x U605 (Tabela 6). Por outro lado, coeficientes de correlação não-significativos foram determinados entre polimorfismos moleculares do gene *VRN3* e resposta à vernalização, para ambas as populações (Tabela 6).

TABELA 6. Coeficientes de correlação entre polimorfismos moleculares do gene *VRN3* e as variáveis determinadas no experimento de vernalização; tratamento vernalizado (VERN), tratamento não-vernalizado (NVERN) e resposta à vernalização (RVERN), para as populações de aveia de U8 x U605 e U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa. 2007.

População: U8 x U605		
Variável	r	Pr > [r]
Polimorfismo molecular		
Vernalizado (Vern)	0,23	0.0060*
Não-vernalizado (Nvern)	0,14	0.1019 ^{ns}
Resposta à vernalização (Rvern)	0,06	0.4796 ^{ns}
População: U71 x Pc68		
Vernalizado (Vern)	0,14	0.1066 ^{ns}
Não-vernalizado (Nvern)	0,08	0.3915 ^{ns}
Resposta à vernalização (Rvern)	0,04	0.6944 ^{ns}

^{ns} e * Não significativo e significativo a 5% de probabilidade, respectivamente.

Os resultados apresentados acima sugerem que o gene *VRN3* não contribuiu significativamente para explicar a natureza genética e molecular da resposta à vernalização observada nas populações de aveia U8 x U605 e U71 x Pc68. Estudos realizados em trigo e cevada demonstraram que o gene *VRN3* participa apenas da rota de vernalização em cultivares que possuem alelos funcionais do gene *VRN2* (Tranquilli & Dubcovsky, 2000; Dubcovsky *et al.*, 2005). O gene *VRN2* é um repressor do florescimento capaz de inibir a expressão dos genes *VRN3* e *VRN1*, até que o requerimento à vernalização seja satisfeito (Yan *et al.*, 2004a; Yan *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis thaliana*, nenhuma associação entre o requerimento à vernalização e o gene *FT* (*Flowering Locus T*) foi descrita até o momento (Michaels *et al.*, 2005). O gene *FT* é ortólogo aos genes *VRN3* de trigo e cevada e *Hd3a* do arroz.

De acordo com o modelo genético proposto neste trabalho (item 4.3), a resposta à vernalização em aveia é controlada pela combinação de diferentes alelos

do gene *VRN1*. Desta forma, genótipos brasileiros de aveia não possuem alelos funcionais do gene *VRN2*. Conseqüentemente, os alelos recessivos (*vrn2*) presentes, eliminam o efeito do gene *VRN3* de rotas metabólicas em resposta à vernalização em aveia.

Por outro lado, o gene *VRN3* em aveia, deve regular processos metabólicos em resposta ao fotoperíodo, independente do requerimento à vernalização, como ocorre em trigo e cevada de primavera. Nestas espécies, alelos dominantes do gene *VRN3* conferem fenótipo com florescimento precoce e a expressão gênica é induzida sob condições de dias longos (Trevaskis *et al.*, 2007). Além disso, expressão do gene *VRN3* leva à superexpressão do gene promotor do florescimento *VRN1*, tornando as plantas competentes ao florescimento (Yan *et al.*, 2006).

No presente estudo, alelos dominantes do gene *VRN3* foram detectados para os genitores U8 e U71. A elevada precocidade, insensibilidade ao fotoperíodo e insensibilidade à vernalização do genitor U8 (Federizzi *et al.*, 1996; Locatelli *et al.*, 2008) pode estar associada à presença de alelos dominantes do gene *VRN3* e *VRN1*. Por outro lado, os alelos dominantes do gene *VRN3* presentes no genitor U71, não devem apresentar efeito promotor do florescimento, uma vez que este genótipo não carrega alelos dominantes do gene *VRN1*. A ausência de alelos dominantes do gene *VRN1* caracteriza a resposta à vernalização presente no genótipo U71 (Locatelli *et al.*, 2008). Os genitores U605 e Pc68 carregam alelos recessivos do gene *VRN3*. O genitor U605, da mesma forma que U71, não deve carregar alelos dominantes do gene *VRN1*, uma vez que apresenta resposta à vernalização. Já o genitor Pc68, de maneira contrária aos genitores U71 e U605, não apresenta resposta à vernalização e, possivelmente, carrega alelos dominantes

do gene *VRN1*. Por outro lado, a ausência de alelos dominantes do gene *VRN3* neste genótipo impede o florescimento precoce e poderia explicar a sua elevada sensibilidade ao fotoperíodo (Locatelli *et al.*, 2008).

Apesar dos esforços feitos neste estudo, os resultados até aqui alcançados não foram suficientes para concluir sobre a verdadeira função do gene *VRN3* em aveia. Entre as principais estratégias que permitirão identificar no futuro a função do gene *VRN3* e outros genes em aveia associados com o florescimento e resposta à vernalização, destacam-se: i) avaliação da interação entre os fatores vernalização, comprimento do dia e temperatura sobre o carácter florescimento em ambiente controlado; ii) avaliação do florescimento em diferentes épocas de semeadura em condições brasileiras de cultivo, onde os genótipos apresentam o máximo valor adaptativo e; iii) mapeamento molecular do gene *VRN1*, o qual vai permitir determinar a sua ligação com o gene *VRN3*, bem como determinar o efeito destes genes sobre respostas de vernalização, fotoperíodo e precocidade.

Como consequências positivas aos programas de melhoramento, a incorporação e seleção dos principais genes envolvidos com o florescimento e fontes de diversidade adaptativa em aveia poderão ser assistidos por marcadores moleculares. Com isso, o fator “ambiente”, o qual exerce grande efeito sobre o florescimento pode ser minimizado ou eliminado, permitindo maior eficiência de seleção e maior potencial de rendimento de grãos.

4.7 Mapeamento de QTLs associados ao florescimento e resposta à vernalização em aveia

QTLs associados com o número de dias ao florescimento e resposta à vernalização foram detectados nas populações de aveia U8 x U605 e U71 x Pc68.

O mapeamento de QTLs por intervalo simples (SIM) com base em modelos lineares aditivos forneceu fortes evidências que o marcador molecular DArT 464623b está associado com o número de dias ao florescimento e resposta à vernalização na população U8 x U605. O marcador DArT 464623b foi mapeado no grupo de ligação 6 e apresentou efeito principal significativo para as características fenotípicas; número de dias ao florescimento na semeadura do tarde (NDFtarde), número de dias ao florescimento de plantas não-vernalizadas (NVERN) e resposta à vernalização (RVERN) (Tabela 7).

O QTL associado com o número de dias ao florescimento de plantas avaliadas na semeadura do tarde (NDFtarde) explicou 12% da variação fenotípica observada entre as linhagens recombinantes da população U8 x U605. Estes resultados indicam que os alelos do genitor U605 para o loco 464623b atrasaram o florescimento em média de três dias (Tabela 7). Desta forma, o alelos do genitor U605 conferiram florescimento tardio, uma vez que o requerimento à vernalização não foi satisfeito para este genótipo em condições de campo. Por outro lado, o loco 464623b não apresentou efeito principal significativo para o número de dias ao florescimento na semeadura do cedo (NDFcedo) e resposta à semeadura do cedo (RSC) (Tabela 7).

Em plantas não-vernalizadas (NVERN), os alelos do genitor U605 para o loco 464623b foram associados com florescimento tardio, onde o número de dias ao florescimento foi atrasado em média 6,7 dias. O QTL associado com o número de dias ao florescimento de plantas que não receberam o tratamento de vernalização explicou 19,1% da variação fenotípica observada entre as linhagens recombinantes (Tabela 7). Em plantas vernalizadas (VERN), os alelos do genitor U605 também atrasaram o florescimento, porém de maneira menos intensa, sendo que seus

efeitos não foram significativos (Tabela 7). Isto pode ser facilmente explicado, uma vez que o tratamento de vernalização diminuiu as diferenças entre os alelos sensíveis à vernalização presentes no genitor U605 e os alelos insensíveis à vernalização do genitor U8.

Os alelos do genitor U605 para o loco 464623b também foram associados com a resposta à vernalização (RVERN), os quais anteciparam o florescimento em média de 5,2 dias (Tabela 7). A resposta à vernalização foi determinada através da diferença do número de dias ao florescimento entre plantas não-vernalizadas e vernalizadas. O QTL associado à RVERN explicou 20% da variação determinada entre as linhagens e representou o loco de maior efeito determinado para a população U8 x U605.

TABELA 7. Resumo da análise de QTLs afetando o número de dias ao florescimento e resposta à vernalização, para a população de aveia U8 x U605. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

Variável	Grupo ligação	Distância cM	Loco	Ts máximo	Efeito principal	Varição Fenotípica (%)
NDFcedo	6	29,6	464623b	6,9	1,2 ^{ns}	-
NDFtarde	6	29,6	464623b	14,5	3,0*	12,0
RSC	6	26,6	464623b	10,2	-1,8 ^{ns}	-
VERN	6	34,6	464623b	7,8	1,5 ^{ns}	-
NVERN	6	34,6	464623b	23,7	6,7**	19,1
RVERN	6	34,6	464623b	20,5	-5,2**	20,0

^{ns}, * e ** Não-significativo, significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. A taxa de erro tipo I para o mapeamento por intervalo simples foi baseada em 10.000 testes aleatórios de permutação para cada característica individualmente.

Os resultados obtidos acima foram consistentes com a análise de QTLs ligados com a resposta à vernalização realizada na população de aveia Kanota x Ogle (Holland *et al.*, 1997). Neste estudo, o marcador RFLP Xbcd1968B localizado no grupo de ligação 24 apresentou associação para ambos os tratamentos; vernalizado e não-vernalizado, porém a associação foi reduzida pelo tratamento de

vernalização. Em plantas não-vernalizadas, os alelos de Kanota (sensível à vernalização) para o loco Xbcd1968B foram associados com florescimento tardio, os quais atrasaram o florescimento em média 4,4 dias, explicando 37% da variação fenotípica. Quando as plantas foram submetidas ao tratamento de vernalização, os alelos do genitor Kanota para o loco em questão atrasaram o florescimento em apenas 2,2 dias e explicaram 14% da variação fenotípica. Como resultado, os alelos de Kanota foram associados com a resposta à vernalização de 2,2 dias e o loco Xbcd1968B explicou 29% da variação fenotípica.

O gene *VRN3* não apresentou associação significativa com as características fenotípicas analisadas. Estes resultados concordam com a hipótese de que este gene não está envolvido no controle genético da resposta à vernalização em aveia, descrita no item 4.6. Porém, este gene deve representar uma região genômica de grande efeito sobre a precocidade na população U8 x U605.

Para a população U71 x Pc68, o mapeamento de QTLs por intervalo simples (SIM) identificou forte associação do marcador molecular DArT 465090 com as características fenotípicas determinadas em condições de campo. O marcador 465090 foi mapeado no grupo de ligação 10, a uma distância genética de 5,6 cM (Tabela 8).

Em plantas avaliadas na semeadura do tarde (NDFtarde), os alelos do genitor U71 (sensíveis à vernalização) para o loco 465090 foram associados com florescimento tardio, onde o número de dias ao florescimento foi atrasado em média 5,5 dias. O QTL associado com o NDFtarde explicou 22% da variação fenotípica observada entre as linhagens recombinantes. Este QTL representou o QTL de maior efeito detectado na população U71 x Pc68 (Tabela 8).

TABELA 8. Resumo da análise de QTLs afetando o número de dias ao florescimento e resposta à vernalização, para a população de aveia U71 x Pc68. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

Variável	Grupo ligação	Distância cM	Loco	Ts máximo	Efeito principal	Variação fenotípica (%)
NDFcedo	10	5,6	465090	22,7	1,7**	12,1
NDFtarde	10	5,6	465090	55,1	5,5**	22,0
RSC	10	5,6	465090	49,2	-3,7**	20,6
VERN	10	5,6	465090	3,6	0,79 ^{ns}	-
NVERN	10	5,6	465090	0	0,13 ^{ns}	-
RVERN	10	5,6	465090	0,3	0,71 ^{ns}	-

^{ns}, * e ** Não-significativo, significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. A taxa de erro tipo I para o mapeamento por intervalo simples foi baseada em 10.000 testes aleatórios de permutação para cada característica individualmente.

Em plantas avaliadas na semeadura do cedo (NDFcedo), os alelos do genitor U71 atrasaram o florescimento em média 1,7 dias e seus efeitos, embora menores do que plantas avaliadas no tarde, foram considerados significativos. O QTL associado com o NDFcedo explicou 12,1% da variação fenotípica (Tabela 8). Desta forma, os alelos de U71 apresentaram efeito principal significativo para a resposta à semeadura do cedo (RSC), antecipando o florescimento em média 3,7 dias quando as plantas foram semadas no cedo em relação a plantas semadas no tarde. O QTL detectado para RSC explicou 20,6% da variação fenotípica observada na população U71 x Pc68 (Tabela 8).

QTLs associados com o número de dias ao florescimento na semeadura do cedo e do tarde também foram identificados para a população de aveia Ogle x TAMO-301 (Holland *et al.*, 2002). Um QTL de grande efeito foi identificado no grupo de ligação 32 do mapa genético de ligação da população Ogle x TAMO-301. Alelos do genitor TAMO-301 atrasaram o florescimento em ambas as épocas de semeadura, sendo que a vernalização não alterou o efeito deste QTL. Desta forma, este QTL está associado ao florescimento e atua independente da vernalização.

Por outro lado, marcadores moleculares DArT desenvolvidos para a população U71 x Pc68 não apresentaram efeito principal significativo para as características VERN, NVERN E RVERN (Tabela 8). Desta forma, nenhum marcador molecular ligado à QTL que afeta a resposta à vernalização foi detectado nesta população. Diversos fatores podem estar associados com a não detecção de QTLs envolvidos com a resposta à vernalização na população U71 x Pc68, bem como com o baixo número de QTLs identificados na população U8 x U605. Entre os possíveis fatores destacam-se: i) a análise de arranjos de diversidade (DArT) não forneceu uma cobertura completa do genoma, para ambas as populações analisadas. Desta forma, QTLs segregando nestas populações não puderam ser descobertos, uma vez que o número de marcadores moleculares não foi representativo ao longo do genoma; ii) rígido controle do erro estatístico pelo programa MQTL, o qual não permitiu identificar locos com menor efeito principal e significativos para as características fenotípicas analisadas e; iii) o tamanho extenso do genoma da aveia e a complexidade do caráter florescimento, devem ter contribuído significativamente para o baixo número de QTLs identificados neste estudo.

O controle do erro estatístico descrito acima como uma das causas do baixo número de QTLs detectados neste estudo, é um fator importante à ser considerado em qualquer análise de QTL. Um adequado balanço entre poder estatístico (a probabilidade de declarar o efeito de um QTL real) e erro tipo I (a probabilidade de declarar um efeito falso) precisa ser alcançado. Este balanço pode ser controlado através do nível de significância do teste estatístico empregado, porém, não existe nenhuma regra universal para predizer o nível mais apropriado de controle do erro (Rines *et al.*, 2006). No presente estudo, o erro tipo I foi controlado através de um

grande número de testes de permutações, fazendo com que o poder de detecção de QTLs reais tenha sido muito baixo. Por outro lado, esta análise foi conduzida de maneira segura e os QTLs identificados, possivelmente representam regiões genômicas de grande efeito sobre o número de dias ao florescimento e resposta à vernalização.

Em genótipos de aveia cultivados na região Sul do Brasil, a variação para resposta à vernalização deve ser controlada em grande parte pelas diferentes combinações de alelos do gene *VRN1*, presentes nos diferentes genótipos como descrito no item 4.3. Os resultados da análise de QTL conduzidos neste estudo, sugerem que o QTL com efeito maior identificado na população U8 x U605 pode estar ligado ao gene *VRN1*. Desta forma, o marcador molecular DArT 464623b presente na população U8 x U605, bem como o marcador RFLP Xbcd1968B presente na população K x O (Holland *et al.*, 1997) representam marcadores moleculares ou regiões genômicas candidatas para o gene *VRN1* em aveia.

Embora um número muito pequeno de QTLs tenha sido identificado neste estudo, os resultados obtidos representam um grande avanço no entendimento dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos com o caráter resposta à vernalização em aveia. Estes resultados, no entanto, devem ser integrados e validados em outras populações no futuro. Quando a localização genômica de QTLs ligados com a resposta à vernalização estiver bem caracterizada em aveia, estas informações permitirão o desenvolvimento e aplicação do melhoramento molecular através de associações diretas entre caráter e alelos de sensibilidade e insensibilidade à vernalização.

5 DISCUSSÃO GERAL

Genótipos de aveia avaliados sob os tratamentos vernalizado e não-vernalizado apresentaram diferenças no número de dias ao florescimento. Resposta significativa à vernalização foi detectada em três dos dez genótipos de aveia testados; UFRGS 881971, UFRGS 930605 e UFRGS 017164. Os resultados preliminares do efeito da vernalização sobre o florescimento, confirmaram a hipótese inicial de que a iniciação floral em alguns genótipos brasileiros de aveia é dependente de baixas temperaturas.

Um grande número de linhagens recombinantes de aveia foi avaliado quanto a resposta à vernalização em condições de campo e em casa de vegetação. No campo, o pequeno número de dias favoráveis à vernalização na semeadura do cedo, associada com temperaturas elevadas e comprimento do dia muito longo na semeadura do tarde, não permitiram identificar a resposta à vernalização entre genitores e linhagens. Por outro lado, quando as plantas foram submetidas a diferentes tratamentos de vernalização e crescidas sob condições de ambiente controlado, a resposta à vernalização foi determinada de maneira eficiente tanto para os genitores, como para as linhagens recombinantes.

O estudo da herança genética do caráter resposta à vernalização, indicou a existência de dois genes maiores controlando o caráter, em ambas as populações U8 x U605 e U71 x Pc68. A proporção de segregação 3:1 demonstrou que alelos de

insensibilidade à vernalização apresentam efeito de dominância sobre alelos de sensibilidade à vernalização. A partir do modelo genético de controle da resposta à vernalização em trigo e cevada, os resultados deste estudo sugerem que alelos do gene *VRN1* presentes nos diferentes genomas da aveia são responsáveis pela variação genética do requerimento à vernalização.

A clonagem de sequências de aveia com elevado índice de homologia a sequências dos genes *VRN1* e *VRN3* de trigo, cevada e outras espécies de gramíneas, fornecem fortes evidências de que estes genes estão conservados em aveia. *VRN1* e *VRN3* participam de processos regulatórios chaves em resposta à vernalização e fotoperíodo, sendo os principais responsáveis pela variação genética do número de dias ao florescimento em cereais. Sequências dos genes *VRN1* e *VRN3* de aveia são úteis aos programas de melhoramento genético, uma vez que a variação genética destes genes pode ser facilmente identificada pela diferença nas sequências de DNA e marcadores moleculares ligados a estes genes podem ser empregados para simplificar o processo de melhoramento.

A análise de arranjos de diversidade (DArT) foi uma etapa importante deste trabalho, pois gerou um grande número de marcadores moleculares e permitiu a construção de mapas genéticos de ligação de maneira rápida, eficiente e barata, para as populações U8 x U605 e U71 x Pc68. Os resultados desta análise foram empregados para o mapeamento molecular do gene *VRN3* e para a identificação de marcadores moleculares ligados a QTLs que afetam a resposta à vernalização em aveia. Além disso, estes resultados permitem que QTLs e genes envolvidos em outras características de interesse pelos programas de melhoramento possam ser identificados e incorporados ao germoplasma no futuro.

O mapeamento do gene *VRN3* demonstrou que diversos marcadores moleculares em comum foram identificados entre os grupos de ligação onde o gene foi localizado nas diferentes populações. Estes resultados indicam que o gene *VRN3* está localizado em regiões cromossômicas colineares nas populações U8 x U605, U71 x Pc68 e K x O. Entretanto, os resultados sugerem que o gene *VRN3* não participa diretamente do controle da resposta à vernalização em aveia.

Um QTL de grande efeito foi associado com a resposta à vernalização na população U8 x U605. Este QTL está ligado ao marcador molecular DArT 464623b, mapeado no grupo de ligação 6. O mapeamento comparativo realizado entre as populações U8 x U605 e Kanota x Ogle, demonstrou que o grupo de ligação 6 (U8 x U605) está associado ao grupo de ligação 24 (K x O), o qual possui o marcador Xbcd1968B fortemente associado com a resposta à vernalização. Desta forma, ambos os marcadores moleculares 464623b e Xbcd1968 são candidatos ao gene *VRN1*, uma vez que este é o principal gene responsável pela variação do florescimento em resposta à vernalização em aveia.

Os resultados alcançados neste trabalho promoveram maior entendimento de como os genes de vernalização interagem para controlar o florescimento em aveia. Por outro lado, os resultados também permitiram melhor entendimento de como diferentes fatores ambientais afetam o florescimento em genótipos com constituição genética diferenciada. Desta forma, estes resultados contribuem para o desenvolvimento de cultivares de aveia com maior capacidade de adaptação aos diferentes ambientes de cultivo e com maior estabilidade de rendimento de grãos frente as mudanças climáticas que ocorrem com grande frequência.

6 CONCLUSÕES

O florescimento em alguns genótipos brasileiros de aveia é dependente de vernalização na fase inicial de desenvolvimento das plantas.

A herança genética do carácter resposta à vernalização em aveia é controlada por dois genes maiores.

Sequências de aveia homólogas a sequências dos genes de vernalização *VRN1* e *VRN3* de trigo, cevada e outras espécies de gramíneas foram isoladas e caracterizadas em aveia.

O gene *VRN3* está localizado em regiões cromossômicas homólogas e/ou colineares nas populações de aveia UFRGS 8 x UFRGS 930605, UFRGS 881971 x Pc68/*Starter e Kanota x Ogle.

Um QTL de grande efeito associado com a resposta à vernalização foi detectado na população UFRGS 8 x UFRGS 930605 e ligado ao marcador molecular DArT 464623b.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AKBARI, M. *et al.* Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.113, n.8, p.1409-1420, 2006.

ANDERSEN, J.R. *et al.* Vernalization response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) involves orthologues of diploid wheat (*Triticum monococcum*) *VRN1* and rice (*Oryza sativa*) *Hd1*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.60, n.4, p.481-494, 2006.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.9, n.3, p.229-241, 1991.

BARRETT, B. *et al.* Identifying AFLP and microsatellite markers for vernalization response gene *Vrn-B1* in hexaploid wheat using reciprocal mapping populations. **Plant Breeding**, Berlin, v.121, n.5, p.400-406, 2002.

BASTOW, R. *et al.* requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. **Nature**, London, v.427, n.6970, p.164-167, 2004.

BOHLENIUS, H. *et al.* *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. **Science**, Washington, v.312, n.5776, p.1040-1043, 2006.

BONNIN, I. *et al.* *FT* genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.116, n.3, p.383-394, 2008.

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.

BURROWS, V.D. Breeding oats for food and feed: conventional and new techniques and materials. In: OATS: chemistry and technology St.Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1986. p.13-46.

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

COCKRAM, J. *et al.* Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRN-H1/VRN-H2* multi-locus haplotype. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.115, n.7, p.993-1001, 2007.

CORBESIER, L. *et al.* *FT* protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v.316, n.5827, p.1030-1033, 2007.

DUBCOVSKY, J. *et al.* Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, n.5, p.968-975, 1998.

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.

DUBCOVSKY, J. *et al.* Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. **Genetics**, Berlin, v.143, n.2, p.983-999, 1996.

DUBCOVSKY, J.; CHEN, C.; YAN, L. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.15, n.4, p.395-407, 2005.

ERGON, A. *et al.* Quantitative trait loci controlling vernalisation requirement, heading time and number of panicles in meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, n.2, p.232-242, 2006.

FAURE, S. *et al.* The *flowering locus T*-like gene family in barley. **Genetics**, Berlin, v.176, n.1, p.599-609, 2007.

FEDERIZZI, L.C. Progressos no melhoramento genético de aveia no Brasil, história, principais resultados e perspectivas futuras. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 2002, Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo, 2002. p.45-63.

FEDERIZZI, L.C.; BERTAGNOLLI, P.F.; CARVALHO, F.I.F. de. Genetics of flowering time in oat (*Avena sativa* L.). **Journal of Genetics and Breeding**, Roma, v.50, p.147-154, 1996.

FERRÁNDIZ, C.; LILJEGREN, S.J.; YANOFSKY, M.F. Negative regulation of the *Shatterproof* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. **Science**, Washington, v.289, n.5478, p.436-438, 2000.

FU, D.; SZUCS, P.; YAN, L. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.273, n.1, p. 54-65, 2005.

GONCHAROV, N.P. Response to vernalization in wheat: its quantitative or qualitative nature. **Cereal Research Communications**, Szeged, v.32, p.323-330, 2004.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v.41, n.1, p.94-98, 1999.

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.

HEARNDEN, P.R. *et al.* A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.115, n.3, p.383-391, 2007.

HELLIWELL, C.A. *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.

HENDERSON, I.A.; SHINDO, C.; DEAN, C. The need for winter in the switch to flowering. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.37, n.1, p.371-392, 2003.

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.

HOLLAND, J.B. *et al.* QTLs and epistasis associated with vernalization responses in oat. **Crop Science**, Madison, v.37, n.4, p.1306-1316, 1997.

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.

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

IWAKI, K. *et al.* Adaptation and ecological differentiation in wheat with special reference to geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype. **Plant Breeding**, Berlin, v.120, n.4, p.107-114, 2001.

IWAKI, K. *et al.* Genetic analysis of *Vrn-B1* for vernalization requirement by using linked dCAPS markers in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.104, n.4, p.571-576, 2002.

- JACCOUD, D. *et al.* Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, n.4, p.1-7, 2001.
- JENSEN, L.B. *et al.* QTL mapping of vernalization response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals co-location with an orthologue of wheat *VRN1*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.110, n.3, p.527-536, 2005.
- JOHANSON, U. *et al.* Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. **Science**, Washington, v.290, n.5490, p.344-347, 2000.
- KARDAILSKY, I. *et al.* Activation tagging of the floral inducer *FT*. **Science**, Washington, v.286, n.5446, p.1962-1965, 1999.
- KARSAI, I. *et al.* The *Vrn-H2* locus is a major determinant of flowering time in a facultative x winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.110, n.8, p.1458-1466, 2005.
- KIMURA, Y. *et al.* OARE-1, a Ty1-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.42, n.12, p.1345-1354, 2001.
- KING, R.W. *et al.* Regulation of flowering in the long day grass, *Lolium temulentum* L., by gibberellins and the gene *FLOWERING LOCUS T (FT)*. **Plant Physiology**, Rockville, v.141, n.2, p.498-507, 2006.
- KLEINHOF, A. *et al.* A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86, n.6, p.705-712, 1993.
- KOBAYASHI, Y. *et al.* A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. **Science**, Washington, v.286, n.5410, p.1960-1962, 1999.
- KOJIMA, S. *et al.* *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.43, n.10, p.1096-1105, 2002.
- KROSLAK, T. *et al.* Human phosphatylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signalling. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.276, n.43, p.39772-39778, 2001.
- LAGOS, M.B. *et al.* Mecanismos de indução à reprodução sexual em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, p.1491-1496, 1982.
- LANDER, E. *et al.*, MapMaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v.1, n.2, p.174-181, 1987.

LANG, A. Physiology of flower initiation. In: W Ruhland (Eds.) **Encyclopedia of Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1965. p. 1371-1380.

LANG, A.; MELCHERS, G. Vernalization and devernalization in biennial plants. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v.2, p.444-449, 1965.

LAURIE, D.A. *et al.* RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. **Genome**, Ottawa, v. 38, n.3, p. 575-585, 1995.

LEE, H. *et al.* The AGAMOUS-like 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. **Genes and Development**, Norwich, V.14, n.18, p.2366–2376, 2000.

LEHMENSIEK, A. *et al.* Curation of wheat maps to improve map accuracy and QTL detection. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.56, n.12, p.1347-1354, 2005.

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.

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.

MAHFOOZI, S.; LIMIN, A.E.; FOWLER, D.B. Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereals. **Crop Science**, Madison, v.41, n.4, p.1006-1017, 2001.

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

MICHAELS, S.D.; AMASINO, R.M. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. **Plant, Cell and Environmental**, Oxford, v.23, n.6, p.1145-1154, 2000.

MICHAELS, S.D. *et al.* *AGL24* acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. **The Plant Journal**, Oxford, v.33, n.5, p.867-874, 2003.

MICHAELS, S.D. *et al.* Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville v.137, n.1, p.149-156, 2005.

MORRELL, P.L. *et al.* Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilization. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.102, n.7, p.2442-2447, 2005.

MURAI, K. *et al.* *WAP1*, a wheat *APETALA1* homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to reproductive growth. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n.12, p.1255-1265, 2003.

MURPHY, J.P.; HOFFMAN, L.A. Origin, history and production of oat. In: MARSHALL, H.G.; SORRELS, M.E. (Eds.). **Oat Science and Technology**. Madison: Crop Science Society of American, 1992. p.1-28.

NAVA, I.C.; FEDERIZZI, L.C.; PACHECO, M.T. Efeitos da vernalização em genótipos de aveia branca (*Avena sativa* L.). In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 2006, Guarapuava. **Anais**. Guarapuava, 2006. p.180-182.

OOIJEN, J.W. van; VOORRIPS, R.E. **JoinMap®**. Software for the calculation of genetic linkage maps. Versão 3.0. Wageningen, 2001. Disponível em: <http://www.kyazma.nl/index.php/mc.JoinMap>. Acesso em: 20 abril 2008.

PETERSEN, K. *et al.*, MADS-box genes from perennial ryegrass differentially expressed during transition from vegetative to reproductive growth. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.161, n.4, p.439-447, 2004.

PETERSON, D.M. Composition and nutritional characteristics of oat grain and products. In: MARSHALL, H.G.; SORRELS, M.E. (Eds.). **Oat Science and Technology**. Madison: Crop Science Society of American, 1992. p.265-292.

PETERSON, DM. Oat - a multifunctional grain. In: INTERNATIONAL OAT CONFERENCE, 2004, Helsinki. **Proceedings**. Helsinki, 2004. p.21-26.

PINYOPICH, A. *et al.* Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. **Nature**, London, v. 424, n.6944, p.85-88, 2003.

PORTYANKO, V.A. A linkage map of hexaploid oat based on grass anchor DNA clones and its relationship to other oat maps. **Genome**, Ottawa, v.44, n.2, p.249-265, 2001.

PRESTON, J.C.; KELLOGG, E.A. Reconstructing the evolutionary history of paralogous *APETALA1/FRUITFULL*-like genes in grasses (Poaceae). **Genetics**, Berlin, v.174, n.1, p.421-437, 2006.

PUGSLEY, A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v.21, n.3, p.547-542, 1972.

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

RITCHIE, J.T. Genetic specific data for crop modeling. In: PENNING DE VRIES, F.W.T. (Eds.) **Systems approaches for agricultural development**. Netherlands: Kluwer, 1993. p.77-93.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v.132, n.3, p.365-386, 2000.

SEARLE, I. *et al.* The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signalling in *Arabidopsis*. **Genes and Development**, Norwich, v.20, n.7, p.898-912, 2006.

SHELDON, C.C. *et al.* The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, n.3, p.445-458, 1999.

SHELDON, C.C. *et al.* The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.97, n.7, p.3753-3758, 2000.

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, Wisconsin: American Society of Agronomy, 1992. p. 115-163.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.

STELMAKH, A.F. Genetic effect of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v.65, n.1, p.53-60, 1993.

SUNG, S.; AMASINO, R.M. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v.7, n.1, p.4-10, 2004.

SZUCS, P. *et al.* Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.277, n.3, p.249-261, 2007.

SZUCS, P. *et al.* Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, n.7, p.1277-1285, 2006.

TAMAKI, S. *et al.* *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice. **Science**, Washington, v.316, n.5827, p.1033-1036, 2007.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TINKER, N.A.; MATHER, D.E. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. **Journal of Agricultural Genomics**. Santa Fe, 1995. Texto completo disponível em: <http://www.cabi-publishing.org/JAG>. Acesso em: 25 maio 2008.

TRANQUILLI, G.E.; DUBCOVSKY, J. Epistatic interactions between vernalization genes *VRN-A^m1* and *Vrn-A^m2* in diploid wheat. **Journal of Heredity**, Cary, v.91, n.4, p.304-306, 2000.

TREVASKIS, B. *et al.* *HvVRN2* responds to daylength, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. **Plant Physiology**, Rockville, v.140, n.2, p.1397-1405, 2006.

TREVASKIS, B. *et al.* MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. **Proceedings of the National Academy of Science**, 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.

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.

von ZITZEWITZ *et al.* Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.59, n.3, p.449-467, 2005.

WELLENSIEK, S.J. Dividing cells as the prerequisite for vernalization. **Plant Physiology**, Rockville, v.39, p.832-835, 1964.

WENZL, P. *et al.* Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.101, n.26, p.9915-9920, 2004.

WIGGE, P.A. Integration of Spatial and Temporal Information During Floral Induction in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v.309, n.5737, p.1056-1059, 2005.

WIGHT, C.P. *et al.* A molecular marker map in 'Kanota' × 'Ogle' hexaploid oat (*Avena* spp.) enhanced by additional markers and a robust framework. **Genome**, Ottawa, v.46, n.1, p.28-27, 2003.

WITTENBERG, A.H.J. *et al.* Validation of the high-throughput technology DArT using the model plant *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.274, n.1, p.30-39, 2005.

XIA, L. *et al.* DArT for high-throughput genotyping of Cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.110, n.6, p.1092-1098, 2005.

XIE, Y. *et al.* A high-throughput genomic tool: diversity array technology complementary for rice genotyping. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v.48, n.9, p.1069-1076, 2006.

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.* Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.109, n.8, p.1677-1686, 2004a.

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, 2004b.

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.

YANG, S. *et al.* Low level of genetic diversity in cultivated Pigeonpea compared to its wild relatives is revealed by diversity arrays technology. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.113, n.4, p.585-595, 2006.

YEUNG, K. *et al.* Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signaling by RKIP. **Nature**, London, v. 401, n.6749, p.173-177, 1999.

ZHANG, H.; FORDE, B.G. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, Washington, v.279, n.5349, p.407-409, 1998.

ZADOK. Cereal grain development scale. Montana, 2001. Disponível em: http://weeds.montana.edu/crop/Growth_stages_book/p22_23.htm. Acesso em: 12 março 2008.

8 APÊNDICE

APÊNDICE 1. Dados meteorológicos observados de maio à agosto. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

Mês	Dia	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura média (°C)	Comprimento dia (horas)
5	1	14.1	0.8	7.5	14h 17m
5	2	15.7	3.9	9.8	14h 20m
5	3	16.7	3	9.9	14h 22m
5	4	17.7	2	9.9	14h 25m
5	5	14.5	5.8	10.2	14h 28m
5	6	17	2.3	9.7	14h 30m
5	7	22.2	5.1	13.7	14h 33m
5	8	25.7	9.2	17.5	14h 36m
5	9	26.1	12.4	19.3	14h 38m
5	10	27.9	14.3	21.1	14h 41m
5	11	21.8	8	14.9	14h 43m
5	12	14.6	4.1	9.4	14h 46m
5	13	16.8	0.6	8.7	14h 48m
5	14	21.4	3.9	12.7	14h 50m
5	15	16.3	9.9	13.1	14h 53m
5	16	10.8	5	7.9	14h 55m
5	17	10.6	3.8	7.2	14h 57m
5	18	16.3	2	9.2	15h 00m
5	19	23.1	3.1	13.1	15h 02m
5	20	14.3	4.5	9.4	15h 04m
5	21	17.7	2.2	10	15h 06m
5	22	21.1	4.1	12.6	15h 08m
5	23	27.2	8.2	17.7	15h 10m
5	24	32.4	14.9	23.7	15h 12m
5	25	31.3	15.1	23.2	15h 14m
5	26	22.3	10.7	16.5	15h 16m
5	27	15.5	9.3	12.4	15h 17m
5	28	18.8	10.2	14.5	15h 19m
5	29	22.5	7.8	15.2	15h 21m
5	30	26.5	12.1	19.3	15h 22m
5	31	21.6	15.8	18.7	15h 24m
6	1	26.7	15.3	21	15h 25m
6	2	25.3	13.9	19.6	15h 27m
6	3	24.6	12.6	18.6	15h 28m
6	4	19.1	16.1	17.6	15h 29m
6	5	21.2	4.5	12.9	15h 30m

Continuação APÊNDICE 1. Dados meteorológicos observados de maio à agosto. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

Mês	Dia	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura média (°C)	Comprimento dia (horas)
6	6	15.7	3.7	9.7	15h 32m
6	7	17.9	5.8	11.9	15h 33m
6	8	30.8	10.7	20.8	15h 34m
6	9	23.1	13.3	18.2	15h 35m
6	10	26.8	11.6	19.2	15h 35m
6	11	28.4	15.6	22	15h 36m
6	12	31.7	16.8	24.3	15h 37m
6	13	26.5	15.6	21.1	15h 38m
6	14	26.3	13.2	19.8	15h 38m
6	15	28.8	14.8	21.8	15h 39m
6	16	31.1	16.6	23.9	15h 39m
6	17	26.9	15.6	21.3	15h 39m
6	18	25.1	13.7	19.4	15h 40m
6	19	31.3	15	23.2	15h 40m
6	20	23.3	12.6	18	15h 40m
6	21	21.8	10.8	16.3	15h 40m
6	22	19.7	10	14.9	15h 40m
6	23	19.8	8.4	14.1	15h 40m
6	24	23.3	10.4	16.9	15h 40m
6	25	30	16.3	23.2	15h 39m
6	26	34.2	17.9	26.1	15h 39m
6	27	33.6	21.2	27.4	15h 39m
6	28	23.8	11.4	17.6	15h 38m
6	29	24.8	9	16.9	15h 38m
6	30	20.9	9.1	15	15h 37m
7	1	19.4	8.4	13.9	15h 36m
7	2	23.7	8.2	16	15h 35m
7	3	26	11.4	18.7	15h 35m
7	4	21.5	13.3	17.4	15h 34m
7	5	24.4	15.8	20.1	15h 33m
7	6	27	13.9	20.5	15h 32m
7	7	20.4	12.6	16.5	15h 31m
7	8	21.7	15.4	18.6	15h 29m
7	9	28.6	16.6	22.6	15h 28m
7	10	26.8	19.4	23.1	15h 27m
7	11	27.4	14.6	21	15h 25m
7	12	24	12.1	18.1	15h 24m
7	13	21.4	12.7	17.1	15h 22m
7	14	21.8	11.7	16.8	15h 21m
7	15	24.1	14.4	19.3	15h 19m
7	16	25.3	11.3	18.3	15h 18m
7	17	26.4	12.4	19.4	15h 16m
7	18	27.4	15.6	21.5	15h 14m
7	19	21.2	16.3	18.8	15h 12m

Continuação APÊNDICE 1. Dados meteorológicos observados de maio à agosto. AAFC-CEF, Ottawa, 2007.

Mês	Dia	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura média (°C)	Comprimento dia (horas)
7	20	19.6	13.3	16.5	15h 10m
7	21	25.5	11.1	18.3	15h 08m
7	22	26.2	13.1	19.7	15h 06m
7	23	27	13.1	20.1	15h 04m
7	24	26.6	17.2	21.9	15h 02m
7	25	28.9	15.5	22.2	15h 00m
7	26	29.7	16.9	23.3	14h 58m
7	27	29.7	18.8	24.3	14h 56m
7	28	23.8	18.4	21.1	14h 53m
7	29	26.2	15.7	21	14h 51m
7	30	28.7	14.3	21.5	14h 49m
7	31	29.7	17.7	23.7	14h 46m
8	1	31	17.3	24.2	14h 44m
8	2	34.1	19.6	26.9	14h 41m
8	3	32.1	17.9	25	14h 39m
8	4	24.8	15.3	20.1	14h 36m
8	5	25.4	11.6	18.5	14h 34m
8	6	26.9	14.4	20.7	14h 31m
8	7	25.5	18.6	22.1	14h 29m
8	8	28.9	16.7	22.8	14h 26m
8	9	23	13.1	18.1	14h 23m
8	10	26.6	15.5	21.1	14h 21m
8	11	29.8	14.6	22.2	14h 18m
8	12	31	17.3	24.2	14h 15m
8	13	25.4	14	19.7	14h 12m
8	14	22.3	10.5	16.4	14h 10m
8	15	25.2	14.7	20	14h 07m
8	16	27.3	13	20.2	14h 04m
8	17	24	10.4	17.2	14h 01m
8	18	19.1	10.8	15	13h 58m
8	19	20.4	8.8	14.6	13h 55m
8	20	20.2	7.8	14	13h 53m
8	21	22.6	9	15.8	13h 50m
8	22	20.2	9.6	14.9	13h 47m
8	23	25.4	16.5	21	13h 44m
8	24	28.3	20.5	24.4	13h 41m
8	25	27.3	18.5	22.9	13h 38m
8	26	24.2	14.1	19.2	13h 35m
8	27	24.6	10.3	17.5	13h 32m
8	28	27.4	12.9	20.2	13h 29m
8	29	31	16.6	23.8	13h 26m
8	30	21.9	12.5	17.2	13h 23m
8	31	23.4	11.1	17.3	13h 20m