

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

CARACTERIZAÇÃO E PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADOS
AO DEGRANÉ E DORMÊNCIA DE SEMENTES EM ARROZ VERMELHO

Catarine Markus
Engenheira Agrônoma/UFPEL

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Herbologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Markus, Catarine
CARACTERIZAÇÃO E PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA
RELACIONADOS AO DEGRANE E DORMÊNCIA DE SEMENTES EM
ARROZ VERMELHO / Catarine Markus. -- 2013.
131 f.

Orientador: Aldo Merotto Júnior.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2013.

1. Dormência e degrane das sementes. 2. Arroz
vermelho. I. Merotto Júnior, Aldo, orient. II. Título.

CATARINE MARKUS
Engenheira Agrônoma - UFPel

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

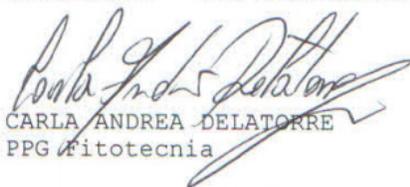
MESTRE EM FITOTECNIA

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

Aprovado em: 06.03.2013
Pela Banca Examinadora



ALDO MEROTTO JUNIOR
Orientador - PPG Fitotecnia



CARLA ANDREA DELATORRE
PPG Fitotecnia

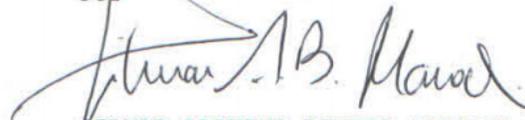


MARCIA M. A. NACHENVENG PINHEIRO MARGIS
PPG Genética e Biologia Molecular/UFRGS



DIRCEU AGOSTINETTO
Departamento de Fitossanidade
UFPel

Homologado em: 17 DEZ 2013
Por



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



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

DEDICO

À minha família.

*“Quando a ideia de repouso sugerir o
adiantamento da obra que te cabe fazer,
persiste com a disciplina mais um pouco e
o dever bem cumprido ser-nos-á alegria
perene .”*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelas oportunidades e por me conduzir nas melhores escolhas.

Ao Professor Aldo Merotto Jr. pela orientação, motivação e pelos ensinamentos concedidos durante os dois anos de mestrado. Também aos Professores da UFPEL e da UFRGS, em especial a Professora Carla Andrea Delatorre e aos demais Professores do Departamento de Plantas de Lavoura, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha família, meus pais Bernadeth Markus e Vilmar Markus, meus irmãos Paloma Markus e Arno Henrique Markus, pelas palavras de conforto, pelo exemplo e pelo total apoio. Agradeço a todos (avós, tios, tias, primos e primas) pela compreensão de todos vocês com a minha ausência em períodos de estudo e pesquisa.

Ao meu noivo Ismael Scheeren, que me apoiou incondicionalmente, pela dedicação, paciência, carinho e amor. Agradeço pelo companheirismo em todos os momentos, principalmente nos desafios que enfrentamos nesse período, que nos permitiram evoluir profissionalmente e pessoalmente.

Aos amigos do período de graduação e aos amigos de Teutônia, pelas palavras de incentivo, momentos valiosos de descontração e pela compreensão em períodos de estudo que precisei me ausentar.

Ao ex-colega e atual Professor do Instituto Federal do Rio Grande do Sul (IFRS)/Campus Sertão, Anderson Luis Nunes pela solicitude, dicas e conselhos valiosos durante esse período.

Aos meus colegas e amigos Danielle Alemeida, Thanise Füller, Silmara Correia, Everton Bortoly, Giliardi Dalazen, Kelly Pellizzaro, Adriana Figueiró, Juliano Fuhrmann Wagner, Guilherme Menegati, Cecilia Giordano, Carolina Tessele, Thaís Raquel Hagemann, Ana Carolina Roso, ao amigo e colega que mesmo longe se faz presente, Ezequiel de Oliveira, e demais colegas, pela ativa troca de experiências, contribuições importantes, ensinamentos, palavras de conforto em momentos difíceis e principalmente pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Plantas de Lavoura Maria Alice Weber, Karina Pieretti e em especial ao Fábio Martins Berndt pela competência, paciência, ajuda e amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica Valmir Kupas, Cátia Meneguzzi e José Ari Nenê Barcelos pelo ótimo convívio, agradáveis dias de trabalho e pela contribuição neste trabalho.

À sociedade brasileira, que através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), financiou esta pesquisa.

CARACTERIZAÇÃO E PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA RELACIONADOS AO DEGRANE E DORMÊNCIA DE SEMENTES EM ARROZ VERMELHO¹

Autora: Catarine Markus
Orientador: Aldo Merotto Jr.

RESUMO

O arroz vermelho é considerado daninho principalmente devido às características de degrane e dormência das sementes, que contribuem para a perpetuação desta espécie na lavoura de arroz. A melhor compreensão destes mecanismos poderá ser utilizada para desenvolver tecnologias que proporcionam o controle desta planta daninha. O objetivo desta dissertação foi avaliar a expressão gênica e variação nucleotídica de genes relacionados ao degrane e dormência em sementes de arroz vermelho. O estudo foi realizado com a espécie silvestre *O. glaberrima*, cultivares de arroz e ecótipos de arroz vermelho providos do sul do Brasil. A caracterização fenotípica mostrou que os ecótipos de arroz vermelho apresentam alto nível de degrane em comparação com cultivares de arroz, que possuem pouca variabilidade desta característica. Já a dormência das sementes apresentou grande variabilidade nos ecótipos de arroz vermelho e mostrou-se reduzida nas cultivares de arroz analisadas. A expressão do gene *OsXTH8* teve relação direta com o caráter degrane. De forma contrária, a expressão do gene *OsCel9D* foi relacionada com a repressão deste caráter nos genótipos avaliados. O gene *Sh4* não apresentou relação com o processo de degrane. Os genótipos Batatais, Nipponbare, AV 503 e *O. glaberrima* não apresentaram a mutação G₂₃₇T no gene *Sh4*, indicando que este gene não possui envolvimento com o processo de domesticação dos genótipos avaliados. Com relação à dormência das sementes, a expressão do gene *OsCYP707A5* não foi associada com essa característica em nenhum dos momentos avaliados. Aos 14 dias após a antese e em sementes maduras, os genes *Sdr4* e *OsMADS29* apresentam, respectivamente, relação positiva e negativa com a dormência das sementes de arroz vermelho. Durante o processo de germinação das sementes a expressão do gene *OsMADS29* apresentou efeito negativo, enquanto que o gene *Sdr4* mostrou relação positiva com o caráter dormência. Desta forma, os resultados encontrados sobre a dormência de sementes de arroz vermelho em comparação aos dados descritos na literatura para arroz cultivado são diferentes para o gene *OsCYP707A5* e são similares para os genes *Sdr4* e *OsMADS29*. O gene *Sh4* não está associado ao degrane de sementes em arroz vermelho, contrariamente ao indicado em arroz cultivado. Os genes *OsXTH8* e *OsCel9D*, até então pouco relacionados ao degrane de sementes, estão associados à ocorrência desta característica em arroz vermelho.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (131p.) Março, 2013.

CHARACTERIZATION AND PATTERN OF GENE EXPRESSION RELATED TO THE SHATTERING AND SEED DORMANCY IN RED RICE ²

Author: Catarine Markus
Adviser: Aldo Merotto Jr.

ABSTRACT

Red rice is the most important weed of the rice crop due to the occurrence of seed shattering and seed dormancy. The better understanding of regulation of these processes can be used to develop biotechnological and management technologies to mitigate the red rice infestation in rice fields. The aim of this study was to evaluate the variability of gene expression and nucleotide composition of genes related to seed shattering and seed dormancy in red rice. The study was based on red rice ecotypes, *O. glaberrima* and rice varieties from southern Brazil. The seed shattering of the red rice ecotypes was higher in comparison with the rice varieties, that have little variability of this trait. In contrast, seed dormancy had great variability in red rice ecotypes and this was reduced in the rice varieties. The expression of the gene *OsXTH8* was directly associated with the seed shattering. Otherwise, the *OsCel9D* expression was related with the suppression of this characteristic. The gene *Sh4* was not associated with the seed shattering. The genotypes Batatais, Nipponbare, AV 503 and *O. Glaberrima* didn't show the G₂₃₇T mutation in exon one of the gene *Sh4*, indicating that this gene has no involvement with the process of domestication of analyzed genotypes. In respect to seed dormancy, the gene expression of *OsCYP707A5* was not related with this trait in any of the seed development and germination evaluated stages. At 14 days after anthesis and in mature seeds the genes *OsMADS29* and *Sdr4* were, respectively, positive and negative related with seed dormancy. During seeds germination, the gene *Sdr4* had a positive effect on seed dormancy of red rice, and *OsMADS29* gene had negative relationship with that character. During the seed germination the genes *OsCYP707A5*, *OsMADS29* and *Sdr4* were not associated, negative and positively related with seed dormancy of red rice. The seed dormancy in red rice in comparison to the described results for cultivated rice is differently related for the *OsCYP707A5* gene, and is similarly associated for the genes *Sdr4* and *OsMADS29*. In opposition with what was found in cultivated rice, the *Sh4* gene is not associated with seed abscission process in red rice. The *OsXTH8* and *OsCel9D* genes, not previously associated with seed shattering in rice cultivars, are associated with these trait in red rice.

² Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (131p.) March, 2013.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	4
2.2 Arroz vermelho (<i>Oryza sativa</i> L.)	5
2.3 Degrane	8
2.3.1 Aspectos gerais.....	8
2.3.2 Aspectos morfológicos do degrane	10
2.3.3 Aspectos genéticos e moleculares.....	13
2.4 Dormência.....	24
2.4.1 Característica adaptativa	24
2.4.2 Aspectos genéticos e moleculares.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Degrane	39
3.1.1 Material vegetal.....	39
3.1.2 Avaliação fenotípica do degrane em populações de <i>Oryza spp.</i>	41
3.1.3 Expressão de genes relacionados à parede celular e ao degrane através de RT-PCR em tempo real	42
3.1.4 Análise da variabilidade nucleotídica do gene <i>Sh4</i>	47
3.2 Dormência.....	52
3.2.1 Material vegetal.....	52
3.2.2 Análise fenotípica da dormência em populações de <i>Oryza spp.</i>	52
3.2.3 Expressão de genes relacionados à dormência através de RT-PCR em tempo real	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 Degrane	63
4.1.1 Análise fenotípica de genótipos de arroz quanto ao nível de degrane... ..	63

	Página
4.1.2 Expressão de genes relacionados à parede celular na junção entre o pedicelo e a flor	66
4.1.3 Expressão e variação nucleotídica do gene <i>Sh4</i>	72
4.2 Dormência.....	77
4.2.1 Análise fenotípica de genótipos de arroz quanto ao nível de dormência	77
4.2.2 Expressão de genes relacionados à dormência das sementes	92
5 CONCLUSÕES.....	117
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
7 APÊNDICES	128
8 VITA.....	131

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Denominação, tipo, espécie, fornecedor, origem e nível de degrane conforme Nunes, (2012) dos genótipos analisados no estudo de degrane. Porto Alegre, RS, 2013.	40
2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para RT-PCR em tempo real, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado.	45
3. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para sequenciamento do gene <i>Sh4</i> , temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado (Nunes, 2012).....	50
4. Denominação, tipo, espécie, origem e fornecedor dos genótipos de arroz avaliados quanto à dormência. Porto Alegre, RS. 2013.....	52
5. Genótipos utilizados na análise de expressão de genes relacionados ao caráter de dormência das sementes e nível de dormência conforme análise fenotípica do ano de 2011.....	57
6. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para o estudo da expressão gênica de genes relacionados à dormência das sementes, através da técnica de RT-PCR em tempo real, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado. Porto Alegre, RS. 2013.....	61
7. Taxa de germinação a campo de sementes de cultivares de arroz, ecótipos de arroz vermelho e espécie <i>O.glaberrima</i> germinadas aos 19, 31 e 43 meses após serem depositadas no solo.....	78
8. Análise da dormência das sementes dos ecótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e espécie silvestre <i>O.glaberrima</i> , no primeiro, segundo e terceiro ano de estudo.	83
9. Análise da viabilidade das sementes, sementes não viáveis, dos ecótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e espécie silvestre <i>O.glaberrima</i> , no primeiro, segundo e terceiro ano de estudo.....	88
10. Análise da viabilidade das sementes, sementes viáveis, dos ecótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e espécie silvestre <i>O.glaberrima</i> , no primeiro, segundo e terceiro ano de estudo.....	89
11. Relação da expressão dos gene avaliados, <i>OsCYP707A5</i> , <i>Sdr4</i> e <i>OsMADS29</i> com o caráter de dormência em momento distintos no desenvolvimento da semente. Porto Alegre, RS. 2013.	114

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Parte mediana da panícula apresentando antese (A). Região de estudo da expressão dos genes relacionados ao degrane, ligação da flor (1,5 mm) com o pedicelo (1 mm) (B). Porto Alegre, RS. 2013	43
2. Gel de agarose 2% com as bandas resultantes da amplificação do gene <i>Sh4</i> com conjuntos de <i>primers</i> testados na cultivar de arroz Nipponbare. Marcador <i>Ladder</i> 100 pb (Invitrogen); Pair A, B, C, D, E, F e G. Porto Alegre, RS. 2013.....	51
3. Ilustração da análise de germinação e dormência das sementes: Sacos contendo as sementes no momento em que foram retirados do solo (A); Sacos depois de lavados com água destilada (B); Sementes em processo de germinação a campo (C); Sementes germinadas a campo (D); Sementes colocadas em condições ideais para o processo de germinação (E); Semente de arroz em processo de germinação, radícula com 1 mm de comprimento (F). Porto Alegre, RS. 2013.	54
4. Momentos da coleta de material para extração de RNA: Semente em formação – embrião em formação, aos 14 dias após antese (A); Sementes maduras – embrião maduro, aos seis meses após colheita (B); Sementes germinando – às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação (C). Porto Alegre, RS. 2013.....	59
5. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo, no momento da maturação fisiológica das sementes, nos genótipos de arroz avaliados – Safra de 2011/12. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Porto Alegre, RS. 2013.	64
6. Expressão relativa do gene <i>OsCel9D</i> em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre <i>O. glaberrima</i> , aos dez dias após a polinização. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.	68
7. Relação da resistência à tensão de ruptura com a expressão relativa do gene <i>OsCel9D</i> . Regressão significativa através do teste de Fischer ($p \leq 0,05$). Porto Alegre, RS. 2013.	69
8. Expressão relativa do gene <i>OsXTH8</i> em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre <i>O. glaberrima</i> , aos dez dias após a polinização. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.	70

9. Relação da resistência à tensão de ruptura com a expressão relativa do gene *OsXTH8*. Regressão significativa através do teste de Fischer a $p \leq 0,05$. Porto Alegre, RS. 2013..... 71
10. Expressão relativa do gene *Sh4* em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*, aos dez dias após a polinização. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013. 74
11. Alinhamento parcial das sequências do exon um do gene *Sh4*, em quatro genótipos de arroz, com base na sequência modelo AL606619 (*GenBank*). Fita senso. Porto Alegre, RS. 2013. 76
12. Comparação da taxa de germinação das sementes de genótipos de arroz germinadas a campo e em condições ideais (câmeras). Primeiro ano, 19 meses após deposição no solo (A); Segundo ano, 31 meses após deposição no solo (B); Terceiro ano, 43 meses após deposição no solo (C). 81
13. Taxa de germinação de sementes com e sem casca dos genótipos de arroz aos seis meses após a colheita das sementes. Médias e desvio padrão apresentados. Letras minúsculas comparam os genótipos avaliados, letras maiúscula comparam os genótipos com e sem casca pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Porto Alegre, RS. 2013. 92
14. Expressão relativa do gene *OsCYP707A5* na região do embrião em formação em sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013. 95
15. Expressão relativa do gene *OsCYP707A5* na região do embrião maduro das sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013. 96
16. Etapas de germinação dos genótipos de arroz, observados às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação (HAEG). Sementes sem alteração (SA), em fase I de embebição (FI), fase II de platô (FII), exposição da radícula na fase III (FIII) e germinação com presença de radícula $>1\text{mm}$ (G). Porto Alegre, RS. 2013. 97
17. Expressão relativa do gene *OsMADS29* na região do embrião em formação das sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013. 102
18. Expressão relativa do gene *OsMADS29* na região do embrião maduro em sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013. 103
19. Expressão relativa do gene *OsMADS29* em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*, na

região do embrião em processo de germinação, às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.....	105
20. Expressão relativa do gene <i>Sdr4</i> na região do embrião em formação em sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre <i>O. glaberrima</i> . Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.....	108
21. Expressão relativa do gene <i>Sdr4</i> na região do embrião em sementes maduras dos genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre <i>O. glaberrima</i> . Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.....	109
22. Expressão relativa do gene <i>Sdr4</i> em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre <i>O. glaberrima</i> , na região do embrião das sementes em processo de germinação, às 12 (A), 24 (B), 36 (C), 48 (D) e 60 (E) horas após expostas à germinação. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.....	111

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos alimentos com maior importância para a nutrição humana e destaca-se pela relevância social e econômica que desempenha. No Brasil, o arroz é cultivado praticamente em todos os estados, e consumido por todas as classes sociais, sendo o Rio Grande do Sul (RS) o maior produtor nacional. O cultivo deste cereal no RS tem como principais limitações a competição com plantas daninhas. Dentre as espécies daninhas que infestam as lavouras orizícolas do RS, destaca-se o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.), que é considerada a planta daninha que mais limita o potencial de produtividade da cultura do arroz e está presente em praticamente todas as regiões cultivadas com este cereal.

Apesar de pertencer à mesma espécie do arroz cultivado existem três características bastante peculiares do arroz vermelho, que o tornam indesejável e que resultam em prejuízos ao cultivo do arroz. A primeira está relacionada à cor avermelhada do pericarpo, que deu origem a denominação de “arroz vermelho”, a segunda se refere ao alto nível de degrane ou debulha natural e a terceira está relacionada com a dormência fisiológica das sementes. No entanto, o arroz vermelho é considerado daninho, principalmente, devido ao caráter de degrane e dormência das sementes, que são características que intensificam a perpetuação desta planta daninha na lavoura. Ambas as características contribuem notavelmente para a manutenção do banco de sementes do solo, que é a maior

fonte de novas plantas e que propicia a ocorrência de altas infestações nas áreas cultivadas com arroz irrigado.

Numerosos genes controlam as características de degrane e dormência, que são regulados em função das condições ambientais às quais as plantas estão submetidas. Alguns destes genes já tiveram ação comprovada para os caracteres em questão, no entanto, existem trabalhos que divergem sobre estes resultados. Acredita-se que esta divergência esteja relacionada à variabilidade existente no gênero *Oryza*. No caso dos genes de dormência, a expressão gênica foi relatada somente em etapas isoladas do desenvolvimento das sementes de arroz cultivado. Isto gera a necessidade de estudos que façam a análise da expressão em etapas fisiológicas distintas. Ainda, os conhecimentos existentes foram obtidos considerando apenas variedades de arroz cultivado, e a regulação gênica em arroz vermelho é pouco conhecida.

A melhor compreensão da variabilidade do degrane e da dormência em arroz vermelho poderá ser utilizada para determinar procedimentos de biotecnologia e práticas de manejo que permitam mitigar estas características. Pesquisas neste âmbito já vêm sendo desenvolvidas em alguns países com arroz cultivado. Através do entendimento destas características será possível desenvolver práticas que reduzam os problemas causados pelo arroz vermelho, que é a principal planta daninha do sistema de cultivo do arroz irrigado no Brasil.

Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica e a variabilidade da sequência nucleotídica de genes relacionados ao degrane e a dormência em sementes de arroz vermelho.

Objetivos específicos

- i) Caracterizar fenotipicamente diferentes espécies do gênero *Oryza*, cultivares de arroz e ecótipos de arroz vermelho em relação ao degrane e a dormência das sementes;
- ii) Identificar a relação da expressão dos genes *OsCel9D* e *OsXTH8* com a característica de degrane;
- iii) Avaliar a importância do gene *Sh4* em relação à regulação do degrane em arroz vermelho;
- iv) Identificar a relação da expressão dos genes *OsCYP707A5*, *OsMADS29* e *SDR4* com a dormência das sementes em arroz vermelho em etapas fisiológicas distintas do desenvolvimento das sementes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arroz (*Oryza sativa* L.)

O arroz cultivado pode pertencer basicamente à espécie *Oryza glaberrima* ou à espécie *Oryza sativa* (Panaud, 2009). A espécie *O. glaberrima* é cultivada principalmente na África, nas regiões onde ela não é cultivada, esta planta é considerada uma espécie daninha (Smith & Dilday, 2003). A espécie *O. sativa*, referida como arroz asiático, apresenta maior importância pois é cultivada em todo o mundo. Esta espécie é descrita como originária da Ásia (Doebley, 2006) e acredita-se que tenha evoluído a partir das espécies silvestres *O. nivara* e *O. rufipogon* (Smith & Dilday, 2003). A espécie *O. sativa* é dividida em três subespécies principais: índica, japônica e javanica (Doi *et al.*, 2008; Panaud, 2009).

Atualmente o arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo sendo um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, pois serve de base alimentar para mais de três bilhões de pessoas (SOSBAI, 2012). O Brasil está entre os dez principais países produtores de arroz, cuja produção anual ficou entre 11 e 13 milhões de toneladas nas últimas safras, que corresponde a 82% da produção do Mercosul (SOSBAI, 2012).

No Rio Grande do Sul (RS), o arroz ocupa área superior a 1 milhão de hectares. Este estado é o maior produtor nacional do cereal, sendo responsável por cerca de 61% do total produzido no Brasil (SOSBAI, 2012). A produtividade

média obtida no RS na safra de 2012 foi de 7.439 kg ha⁻¹ (CONAB, 2012). É possível verificar aumento gradativo da produtividade média ao longo dos anos no RS, contudo, ela está aquém da produtividade média obtida em áreas experimentais e em lavouras que adotam alto nível tecnológico (Gomes & Magalhães Jr, 2004). Isto ocorre devido a fatores como uso de sementes não certificadas, semeadura fora do período recomendado, ataque de patógenos e principalmente devido ao controle insatisfatório das plantas daninhas, destacando-se entre estas, o arroz vermelho.

2.2 Arroz vermelho (*Oryza sativa* L.)

O arroz vermelho, também denominado arroz silvestre ou daninho, pertence ao mesmo gênero e espécie do arroz irrigado (*Oryza sativa*). Contudo, existem grandes diferenças entre as populações de arroz vermelho, e dessas em relação ao arroz cultivado (Noldin *et al.*, 1999). Com relação às características morfológicas, as plantas de arroz vermelho geralmente têm porte mais alto que as plantas de arroz cultivado e colmo com coloração levemente avermelhado, o que permite distinguí-las na lavoura (Agostinetto *et al.*, 2001).

Os grãos de arroz vermelho normalmente apresentam forma arredondada com ranhuras longitudinais, além do pericarpo de cor avermelhado, que se diferenciam dos grãos comerciais que são brancos, lisos e cilíndricos (Chung & Paek, 2003). No entanto, plantas de arroz vermelho com altura, coloração do colmo semelhante ao arroz cultivado têm sido encontradas em vários locais. Ainda, existem ecótipos com casca preta e grãos com pericarpo branco, indicando que as características morfológicas, fenológicas e produtivas podem variar conforme o ecótipo do arroz vermelho (Schwanke *et al.*, 2008).

O arroz vermelho é considerado a planta daninha com maior dificuldade de controle no cultivo do arroz irrigado, e pode causar perdas médias no rendimento de grãos em torno de 20%, e em áreas com altas infestações, caso não seja feito seu controle, as perdas podem chegar a 90% (Avila *et al.*, 2000). Isto se deve ao fato do arroz vermelho possuir alta capacidade de competição, o que influencia de forma negativa em diversas etapas do desenvolvimento do arroz cultivado (Fleck *et al.*, 2008). Durante a última década a porcentagem de áreas orizícolas infestadas com arroz vermelho aumentou cerca de 30% (IRGA, 2010). Atualmente 56% de todas as áreas das regiões de cultivo de arroz do RS possuem altas infestações, cuja população varia entre 5-30 plantas/m² (IRGA, 2010).

O arroz vermelho é uma planta daninha de sucesso porque possui uma série de características que contribuem na eficiência da infestação de lavouras e na dificuldade de controle. Dentre elas estão a adaptação a práticas agronômicas, ciclo de desenvolvimento sincronizado com o da cultura, emergência rápida e vigorosa (Delouche *et al.*, 2007). Ainda, no caso do arroz vermelho, pode ser facilmente disperso através de contaminação nas sementes de arroz cultivado, apresenta alto nível de degrane o que inviabiliza a retirada destas da lavoura e apresenta intensa e prolongada dormência das sementes, que mantém a viabilidade das sementes por longos períodos (Delouche *et al.*, 2007).

Algumas práticas de manejo têm sido realizadas como tentativa de atenuar os efeitos adversos da competição do arroz vermelho com o arroz cultivado. Para isso exige-se a interação de vários métodos de controle, como a utilização de sementes de arroz certificadas e isentas de arroz vermelho, rotação de culturas, preparo do solo em sistemas de cultivo mínimo, plantio direto e sistema pré-geminado, semeadura na época recomendada e ainda, alguns métodos de controle biológico (Agostinetto *et al.*, 2001; Gomes & Magalhães Jr, 2004; Fleck *et*

al., 2008). Porém, estas práticas apresentam aplicação limitada e são efetivas apenas se utilizadas conjuntamente.

A rotação de cultura com o cultivo de milho, soja e sorgo pode contribuir na redução da infestação de arroz vermelho, principalmente com associação de herbicidas específicos para controle desta planta daninha (Gomes & Magalhães Jr, 2004). No entanto, as regiões onde o arroz é cultivado normalmente apresentam solos hidromórficos, o que dificulta a rotação com algumas culturas (Hoagland & Paul, 1978; Shivrain *et al.*, 2010). O controle químico com herbicidas seletivos, efetivo para outras plantas daninhas na cultura do arroz, é limitado devido à similaridade genética entre o arroz vermelho e o arroz cultivado (Goulart, 2011). No entanto, para possibilitar o controle químico, foram desenvolvidas cultivares de arroz resistentes a herbicidas do grupo químico imidazolinonas, através de mutações induzidas e seleção (Goulart, 2011). Entretanto, o surgimento de biótipos de arroz vermelho resistentes a imidazolinonas tem se tornado um problema em todo o RS (Menezes *et al.*, 2009).

Cada uma das características citadas acima contribuiu para a complexidade do problema do arroz vermelho na cultura do arroz. No entanto, as características de alto degrane e presença de sementes com elevada dormência diferem o arroz cultivado do daninho e fazem deste último a planta daninha com maior importância na cultura do arroz (Li *et al.*, 2006b). O alto degrane das sementes impede que o arroz vermelho seja retirado da lavoura e permite que as sementes sejam dispersas no banco de sementes do solo. Ainda, a intensa e prolongada dormência das sementes mantém a viabilidade das sementes que caíram no solo através do degrane (Delouche *et al.*, 2007). Isto favorece a perpetuação desta planta daninha na lavoura, uma vez que há entrada dela no sistema de cultivo de arroz irrigado. O estudo e entendimento destas duas

características podem potencializar o desenvolvimento de ferramentas que contribuam para o controle de arroz daninho.

2.3 Degrane

2.3.1 Aspectos gerais

O degrane ou debulha natural é uma característica adaptativa que contribui para a perpetuação da espécie, possibilita a dispersão de sementes e é observado em diferentes níveis em espécies daninhas, cultivadas e silvestres de arroz (Li *et al.*, 2006b; Qin *et al.*, 2010). Ainda, esta característica pode causar perdas consideráveis no rendimento de grãos do arroz cultivado. Assim, um dos passos para o início da domesticação deste cereal foi selecionar plantas com baixo nível de debulha natural (Qin *et al.*, 2010). No início, este processo ocorreu praticamente de forma espontânea já que as sementes que não caiam da planta tinham mais chances de serem colhidas e plantadas nos anos seguintes (Doebley, 2006). Posteriormente, através de técnicas de melhoramento foi possível obter cultivares que apresentavam características como baixo degrane (Lawton-Rauh & Burgos, 2010).

Atualmente, na cultura do arroz o grau de debulha considerado desejável em uma cultivar depende da forma de colheita dos grãos. Nas situações onde a colheita é realizada manualmente é desejável que as cultivares não apresentem degrane, para evitar perdas nos processos de corte e transporte das plantas (Kobayashi, 1990). Já, na colheita mecanizada este processo é mais eficiente nos cultivares que apresentam pequeno grau de degrane, o que contribui para facilitar o processo de separação do grão do restante da palha durante a trilha (Kobayashi, 1990). No entanto, independentemente do mecanismo de colheita utilizado,

elevados níveis de degrane no arroz cultivado são indesejáveis, pois impedem que as sementes sejam colhidas (Delouche *et al.*, 2007).

No arroz vermelho a característica de alto degrane é fundamental para perpetuação da espécie, pois com a ausência deste caráter as sementes produzidas pelas plantas poderiam ser colhidas e retiradas da lavoura, o que diminuiria a infestação desta planta daninha (Machado *et al.*, 2010). Além disso, a debulha natural possibilita que o principal fluxo de queda das sementes ocorra poucos dias antes ou no momento que ocorre a maturação fisiológica das sementes, embora já tenham sido registrados ecótipos que apresentaram debulha a penas 10 dias após a antese (Delouche *et al.*, 2007).

O degrane é uma característica comum a todo arroz vermelho, porém há variação no momento e grau de ruptura entre os ecótipos (Delouche *et al.*, 2007). No entanto, esta variação tende a não ser muito pronunciada, já que os ecótipos que apresentam baixo degrane são eliminados da lavoura no processo de colheita da cultura do arroz. Estudos, realizados nos Estados Unidos, analisaram 17 ecótipos de arroz vermelho quanto ao nível de degrane, e verificaram que 1% dos ecótipos apresentou baixo nível de debulha natural, 6-25% apresentaram nível intermediário e mais de 50% possuíam alto nível de degrane, sendo que o processo de ruptura do grão iniciou-se entre 10-15 dias após a antese (Noldin, 1995). No Sul do Brasil, ecótipos de arroz vermelho provindos de lavouras orizícolas também foram pouco variáveis em relação ao degrane das suas sementes (Schwanke *et al.*, 2008). Neste trabalho, dos 16 ecótipos avaliados, 11 apresentaram fácil degrane, quatro mostraram degrane intermediário e apenas um ecótipo apresentou difícil degrane. Na mesma avaliação, os cultivares BR-IRGA 209, BR-IRGA 410 e El Paso L 144 foram classificados como de degrane intermediário, e IRGA 417 de difícil degrane (Schwanke *et al.*, 2008).

No RS, na safra de 2008/09 e 2010/11, foram avaliados 18 cultivares de arroz, 16 ecótipos de arroz vermelho e duas espécies silvestres quanto ao nível de degrane (Nunes, 2012). Neste trabalho as cultivares apresentaram de médio a baixo nível de degrane. Com relação aos 16 ecótipos de arroz vermelho avaliados, 14 foram de fácil degrane e dois apresentaram degrane intermediário, no primeiro ano de estudo. No segundo ano, 13 ecótipos apresentaram alto degrane e três ecótipos tiveram degrane intermediário (Nunes, 2012). Através destes trabalhos pode-se observar que os genótipos desta planta daninha apresentam pouca variabilidade fenotípica com relação a debulha natural e evidencia-se que a maioria dos ecótipos de arroz vermelho utiliza o degrane como uma das principais formas de dispersão das sementes e perpetuação da espécie. No entanto, ecótipos de arroz vermelho com baixo degrane foram selecionados e utilizados para a produção de linhagens e cultivares destinadas a produção de grãos. A linhagem SCS 119 Rubi está em fase final de avaliação, e mostra-se promissora para atender as exigências de qualidade e produtividade, devendo ser disponibilizada como cultivar em 2013 (Epagri, 2012).

2.3.2 Aspectos morfológicos do degrane

O momento em que ocorre a diferenciação da camada de abscisão pode influenciar no nível de degrane das sementes (Li *et al.*, 2006b). A formação e degradação da camada de abscisão são diferentes quando comparado arroz silvestre *O. rufipogon* com o arroz cultivado (Thurber *et al.*, 2010). No arroz vermelho, antes da floração a camada de abscisão apresenta-se formada e na floração o processo de degradação desta camada já se iniciou. Já no arroz silvestre a camada de abscisão não apresenta degradação até que a floração tenha ocorrido (Thurber *et al.*, 2010). Dessa forma, a diferenciação precoce da

camada de abscisão é fundamental para os genótipos que apresentam elevados níveis de degrane.

A suscetibilidade ao degrane é resultante da presença de uma camada de abscisão formada por pequenas células com parede celular fina entre o grão de arroz e o pedicelo (Li *et al.*, 2006b). A zona de abscisão geralmente compreende uma única camada de células especializadas, com posição e função diferenciadas (Roberts *et al.*, 2002) de onde posteriormente inicia-se a degradação da lamela média e paredes celulares que favorece o processo de ruptura (Patterson, 2001; Roberts *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2010). Essas células têm sido caracterizadas pelo crescimento celular elevado em resposta a etileno e auxina (Osborne & Morgan, 1989).

As plantas que possuem alto nível de degrane, como na espécie silvestre *O. nivara*, possuem esta camada de células contínua, em toda zona de abscisão, que normalmente é formada cerca de 16-20 dias antes da emissão da panícula, quando as panículas possuem de 5-30 mm de comprimento (Jin, 1986; Li *et al.*, 2006b). As plantas que apresentam menores níveis de degrane, como a subespécie indica, quando comparada a espécie *O. nivara* possui a camada de abscisão incompleta. Já, as plantas que possuem pouca debulha natural, como a subespécie japônica, esta camada de abscisão é descontínua e totalmente inexistente na região dos feixes vasculares (Li *et al.*, 2006b).

À medida que as sementes tornam-se maduras, aumentam as chances de ruptura da planta mãe, pois inicia a degradação da camada de abscisão. O processo de abscisão é ocasionado pela produção de etileno, que inibe a síntese de auxina. Enzimas hidrolíticas, como poligalacturonase e β -endo-glucanase, são ativadas nas células da camada de abscisão, causando a degradação da lamela média e da parede celular, resultando na queda do grão (Roberts *et al.*, 2002). A

“Resistência à Tensão de Ruptura” (RTR) do pedicelo é inversamente proporcional ao nível de degrane e em geral diminui ao longo de 10-20 dias após a emissão da panícula em variedades que possuem algum degrane (Ji *et al.*, 2010). A RTR é utilizada quando deseja-se obter a determinação do degrane de forma quantitativa, ela é determinada através da geração de uma força crescente no grão até que ocorra o rompimento da camada de abscisão, sendo o resultado expresso em gramas força (gf). Desta forma, quanto maior a resistência da camada de abscisão à tensão de ruptura exercida pela força menor é o nível de degrane.

A determinação dos níveis de degrane em arroz ainda pode ser realizada de forma qualitativa. Neste método, normalmente o avaliador faz uma pequena pressão com a palma e dedos da mão sobre a panícula e verifica a quantidade de sementes que se desprenderam da planta. Geralmente as notas para o nível de degrane avaliado dessa forma seguem a escala de avaliações do International Rice Research Institute (IRRI, 1980). Determinações do nível de degrane através desta técnica têm sido realizadas no Brasil (Schwanke *et al.*, 2008), na China (Huang *et al.*, 2010) e nos Estados Unidos (Delouche *et al.*, 2007). A principal vantagem é a rapidez da avaliação em relação aos métodos quantitativos. Entretanto, o avaliador necessita de muita experiência para aplicar sempre a mesma pressão na panícula. Esta técnica apresenta baixa reprodutibilidade, pois outro avaliador não conseguiria realizar o mesmo nível de pressão em outra avaliação. Dessa forma é com pouca segurança que poderíamos comparar os níveis de degrane entre diferentes publicações quando a determinação é realizada de forma qualitativa. A determinação do nível de degrane é importante para os processos de avaliações fenotípicas deste caráter. Estes processos

permitem a identificação de genótipos contrastante quando ao degrane e possibilita também estudos moleculares deste caráter.

Estudos moleculares sugerem que numerosos genes estão envolvidos nos processos relacionados ao degrane (Konishi *et al.*, 2006; Thurber *et al.*, 2010). Alguns genes estão envolvidos na diferenciação das células da camada de abscisão ou codificam de proteínas que fazem a clivagem da parede celular, outros genes estão relacionados com a repressão do processo de abscisão (Li *et al.*, 2006a; Konishi *et al.*, 2006; Thurber *et al.*, 2010). Ainda, avanços na identificação de genes expressos durante o processo de separação de células destacam duas classes principais (Roberts *et al.*, 2002). A primeira está envolvida no mecanismo de separação célula a célula. Enquanto que, a segunda é composta por genes associados à proteção celular (Roberts *et al.*, 2002). Ainda, a expressão para proteção celular pode ser localizada tanto nas células da zona de abscisão que ficam na semente, quanto naquelas que permanecem na planta mãe, protegendo as partes expostas do ataque microbiano (Mao *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2002).

2.3.3 Aspectos genéticos e moleculares

O processo de domesticação do arroz resultou em seleção de plantas com baixo nível de degrane, e como consequência ocorreu um aumento da frequência de alelos que não resultam no caráter de debulha natural (Li *et al.*, 2006b). Acredita-se que a evolução dos traços de domesticação, como a perda do degrane, surgiu através de um número relativamente pequeno de alterações genéticas. Contudo, a natureza desses genes e as mudanças moleculares dentro deles ainda não são bem compreendidas (Doebley, 2006). Como a maioria dos cultivares de arroz perdeu o caráter de degrane é complicado obter mutantes

relacionados à debulha natural e revelar os mecanismos moleculares subjacentes, quando se trabalha apenas com cultivares de arroz.

Atualmente sabe-se que o caráter de degrane é controlado por múltiplos genes (Akasaka *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). Foi verificada a presença de *loci* relacionados à debulha natural, nos cromossomos um, dois, três, quatro, sete, oito, dez, onze e doze (Oba *et al.*, 1990; Xiong *et al.*, 1999; Thomson *et al.*, 2003; Konishi *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2010). Até o presente momento já foram citados os *loci* *SH3*, *SH4*, *SH6*, *Sh8*, *qsh1*, *qsh2*, *qsh5*, *qsh11*, *qsh12*, e *sh-h* que desempenham algum papel no degrane (Konishi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006b; Ji *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012).

Numerosos genes parecem estar envolvidos na diferenciação das células da camada de abscisão, considerando que vários QTLs já foram detectados para o caráter de degrane do arroz. No entanto, apenas três genes já tiveram sua ação comprovada sobre o degrane (Li *et al.*, 2006b; Konishi *et al.*, 2006; Thurber *et al.*, 2010). Dois destes genes, *qSH1* e *Sh4*, estão relacionados ao desenvolvimento da camada de abscisão que leva à debulha natural no arroz (Li *et al.*, 2006b; Konishi *et al.*, 2006; Thurber *et al.*, 2010), sendo responsáveis por quase 70% da variação fenotípica nos respectivos cruzamentos realizados (Thurber *et al.*, 2010). O *OsCPL1* é o terceiro gene conhecido, envolvido neste processo, e foi o primeiro gene recessivo a ser identificado para este caráter, diferentemente dos genes *qSH1* e *Sh4* que são dominantes (Ji *et al.*, 2010).

O gene *qSH1* localiza-se no cromossomo um, e através do cruzamento entre duas subespécies, *O. sativa* spp. *indica* e *O. sativa* spp. *japônica*, foi possível explicar 69% da variação fenotípica para o caráter de degrane em função da ação deste gene (Konishi *et al.*, 2006). Com a clonagem e o mapeamento do gene observou-se a presença de um SNP que corresponde a substituição do

nucleotídeo G por T na região regulatória 5' deste gene, a 11841 bases *upstream* (Konishi *et al.*, 2006). Este SNP ocasiona a perda da expressão do gene *qSH1* somente na região entre o pedicelo e a flor, que é responsável pela origem da ausência de debulha no arroz cultivado (Konishi *et al.*, 2006). A confirmação da função do *qSH1* foi realizada através de transformações em arroz, onde as linhagens transgênicas contendo o SNP apresentaram degrane (Konishi *et al.*, 2006). Isso indica que o gene *qSH1* e o SNP na região regulatória 5' são necessários para a ocorrência da debulha natural. Entretanto, a seleção deste gene em genótipos de arroz parece estar relacionada somente à subespécie japônica (Akasaka *et al.*, 2011), pois uma série de trabalhos tem demonstrado que o gene *qSH1* possui pouco efeito sobre o fenótipo da subespécie índica (Zhang *et al.*, 2009; Thurber *et al.*, 2010). Neste mesmo sentido, um estudo realizado por Nunes (2012) verificou que o gene *qSH1* não foi expresso na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização. Este estudo avaliou também a variabilidade nucleotídica de ecótipos de arroz vermelho e de cultivares de arroz e observou que, com exceção da cultivar Nipponbare, o nucleotídeo presente na posição 11841 bases *upstream* do gene *qSH1* era G (Nunes, 2012). Com este resultado seria esperado que houvesse expressão do gene *qSH1* na maioria dos ecótipos e variedades analisados, o que de fato não ocorreu. Cabe ressaltar que o trabalho que verificou a mutação a 11841 bases *upstream* do gene *qSH1* utilizou ecótipos oriundos da subespécie japônica (Konishi *et al.*, 2006), já no estudo desenvolvido por Nunes (2012), os quatro genótipos avaliados pertencem a subespécie índica. Portanto, a mutação na região regulatória 5' do gene *qSH1* parece ser importante nos genótipos que tenham como *background* genético a subespécie japônica (Nunes, 2012).

O gene *OsCPL1* age como repressor da diferenciação da camada de abscisão (Ji *et al.*, 2010). O *locus* recessivo foi localizado entre os marcadores RM7161 e RM8262, no cromossomo sete, em uma linhagem mutante de arroz derivada de uma cultivar da subespécie japônica, que não possui degrane (Ji *et al.*, 2006). Estudos posteriores identificaram que um SNP (G para T) localizado no éxon oito do gene *OsCPL1* (LOC_Os07g10690) muda o aminoácido conservado serina para isoleucina, fazendo com que o fenótipo apresente degrane (Ji *et al.*, 2010). Observou-se que quanto maior a expressão do gene *OsCPL1*, menor é o nível de degrane. Verificou-se também que linhagens transgênicas com o gene *OsCPL1* inativado por RNA de interferência apresentaram níveis elevados de degrane (Ji *et al.*, 2010). Contudo, outro estudo que avaliou a expressão do gene *OsCPL1* e a relação com o nível de degrane em dois ecótipos de arroz vermelho e duas cultivares revelou o contrário do esperado (Nunes, 2012). Neste estudo verificou-se que nos ecótipos de arroz vermelho, que possuem alto degrane, a expressão do gene foi superior em relação as cultivares que possuem menor nível de degrane. Dessa forma, a expressão do gene *OsCPL1* estaria relacionada com a ativação do processo de abscisão, pois a expressão do gene estaria relacionada com a presença do degrane e não com a repressão do degrane como o observado nas análises histoquímicas do estudo de Ji *et al.* (2010).

A explicação para a diferença observada nestes estudos pode estar relacionada com a sequência nucleotídica do gene *OsCPL1*. No fim do intron sete Ji *et al.* (2010) encontraram um SNP (A para T) na posição 5498 do gene que causa uma deleção de 15 pares de bases no mRNA em função de um *splicing* alterado, fazendo com que o fenótipo apresente degrane (Ji *et al.*, 2010). Entretanto, nenhum dos genótipos avaliados por Nunes (2012) apresentou o SNP esperado. Além disso, no exon seis foi observado por Ji *et al.* (2010) três

mutações que não foram encontradas nos 36 genótipos utilizados por Nunes (2012). Neste sentido, a deleção de 15 pares de bases no mRNA em função de um *splicing* alterado pode ter feito com que o gene *OsCPL1* tenha tido uma inversão de função (Nunes, 2012). Assim, a variação da sequência nucleotídica do gene *OsCPL1* pode explicar os resultados obtidos por Ji *et al.* (2010) e Nunes (2012).

O gene *Sh4* (sinônimo *SHA1*) está localizado entre os marcadores RC4-123 e RM280 (Li *et al.*, 2006a) que possuem distância física de cerca de 1360 kb no cromossomo 4 do genoma do arroz (Feng *et al.*, 2002). Através de estudo de QTL, a partir de cruzamentos entre *O. sativa* spp. *indica* e a espécie silvestre *O. nivara*., foi observado que este gene é dominante e explica 69% da variância fenotípica, estando envolvido na degradação da camada de abscisão (Li *et al.*, 2006b; Lin *et al.*, 2007). Neste mesmo estudo, foram identificados também os QTLs *Sh3* e *Sh8*, que também explicam a variância fenotípica, porém em menor quantidade, 6,0 e 3,1%, respectivamente (Li *et al.*, 2006b).

Estudos realizados com o gene *Sh4* observaram mutação (substituição do nucleotídeo G por T, resultando na substituição do aminoácido asparagina por lisina) em uma região de 1,7 kb (Li *et al.*, 2006b). Esta alteração foi responsável pelo desenvolvimento incompleto da camada de abscisão e origem da ausência de debulha no arroz cultivado (Li *et al.*, 2006b; Thurber *et al.*, 2010). A mutação está presente na posição 237 do exon um do gene *Sh4*, que até então não tinha conhecida sua função e que provavelmente é um fator de transcrição. Verificou-se que nas plantas mutadas (mutação G₂₃₇T) a força necessária para a retirada do grão do pedicelo era maior em comparação ao controle (Li *et al.*, 2006b). Isto indica que o gene *Sh4* possui importante função na formação da camada de abscisão e/ou que este gene pode estar envolvido na ativação do processo de

abscisão. Contudo, resultados distintos foram encontrados em outros estudos realizados por Thurber *et al.* (2010), Akasaka *et al.* (2011), Nunes (2012). e Zhu *et al.* (2012).

A existência de acessos de arroz com alto nível de degrane e com a presença da mutação G₂₃₇T no gene *Sh4* foi observada por Thurber *et al.* (2010), o que diferiu de resultados observados por outros autores (Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Ainda, Thurber *et al.* (2010) verificaram que a presença desta única mutação não foi suficiente para conferir redução na debulha natural, pois o único genótipo que não apresentou degrane dentre os acessos analisados, a espécie *O. rufipogon*, não era portadora da mutação G₂₃₇T no gene *Sh4*. Também, contrariamente ao esperado, os biótipos de arroz vermelho avaliados que apresentam naturalmente alta propensão ao degrane apresentaram a mutação T no gene *Sh4* (Thurber *et al.*, 2010). Isto evidencia que a mutação T em *Sh4* foi corrigida primeiramente em um conjunto de cultivares, e espalhou-se rapidamente para grupos de arroz domesticados através de fluxo gênico e seleção (Zhang *et al.*, 2009).

O trabalho que avaliou o cultivares de arroz e genótipos de arroz vermelho provindos da cidade de Okayama no Japão, também não evidenciou relação do gene *Sh4* com o caráter de degrane (Akasaka *et al.*, 2011). Todos os genótipos de arroz vermelho avaliados apresentaram a camada de abscisão completa, o que conferiu o caráter de degrane. Já nas cultivares a camada de abscisão era incompleta e ausente na região dos feixes vasculares e desta forma, apresentavam fenótipo sem degrane (Akasaka *et al.*, 2011). Mesmo apresentado diferenças fenotípicas entre os genótipos daninhos e cultivados, não houve variação na funcionalidade do gene *Sh4*, que não foi funcional em nenhum dos genótipos avaliados (Akasaka *et al.*, 2011). Ainda, foram encontradas novas

mutações no éxon um de *Sh4* em dois genótipos de arroz vermelho, o que não parece estar relacionado com a ocorrência do degrane, já que apenas dois dos cinco genótipos de arroz vermelho com alto degrane apresentaram as mutações (Akasaka *et al.*, 2011). Estes dados indicam que o gene *Sh4* não afeta o degrane em genótipos provindos de Okayama.

Ainda com relação ao gene *Sh4*, um estudo avaliou 166 acessos de arroz silvestre, 222 acessos de arroz daninho e cultivares de arroz, oriundos de regiões da Ásia, sul da Europa e América do Norte (Zhu *et al.*, 2012). Neste trabalho verificou-se que 73,5% dos acessos de arroz silvestre continham o nucleotídeo G na posição 237 do éxon um (Zhu *et al.*, 2012). Enquanto que 26,5% dos acessos silvestres apresentavam a mutação G₂₃₇T no gene *Sh4* (Zhu *et al.*, 2012). Ainda, 100% dos acessos de arroz daninho analisados continham, o nucleotídeo T, diferentemente do esperado, pois todos os acessos de arroz daninho apresentaram degrane (Zhu *et al.*, 2012). Assim, não foi encontrada relação da presença do SNP (G – T) com o degrane nos acessos de arroz silvestre e daninho. Enquanto que na avaliação do sequenciamento das cultivares verificou-se que todas as cultivares de arroz examinadas apresentavam o nucleotídeo T no éxon um do gene *Sh4* (Zhu *et al.*, 2012). A hipótese apresentada por Zhu *et al.* (2012) aborda que a diminuição do caráter de degrane devido a presença do nucleotídeo T pode ocorrer apenas em alguns genótipos que possuem algumas características favoráveis a este evento ou ainda, que haja a presença de outros *loci* que foram previamente selecionados durante o processo de domesticação.

Estudos realizados no Rio Grande do Sul com duas cultivares de arroz (Batatais e Lacassine) e dois ecótipos de arroz vermelho (AV 31 e AV 60), não mostraram relação direta da expressão do gene *Sh4* com a ocorrência do degrane (Nunes, 2012). No entanto, neste último trabalho, os genótipos

analisados não foram sequenciados, o que inviabiliza a verificação da existência da mutação G₂₃₇T no gene *Sh4*.

Cabe ressaltar que logo após o estudo realizado por Li *et al.* (2006b), gerou-se uma grande expectativa com relação a simplicidade do processo de degrane. Estes conhecimentos representaram uma nova perspectiva com relação à possibilidade de controle do arroz vermelho. Pois, se a característica de interesse fosse governada por um gene principal, e este fator fosse passível de manipulação, seria possível mudar o fenótipo, alterando o comportamento do degrane. Ainda, a aparente simplicidade do processo gerou vários outros estudos, o que permitiu verificar que o degrane é uma característica poligênica e complexa. Como alguns estudos divergem quanto aos resultados do envolvimento do gene *Sh4* com os processos de domesticação e caráter de degrane em *O. sativa*, isto gerou a hipótese de que eventos de domesticação tenham ocorrido de forma distinta, conforme a espécie e a região, principalmente durante os primeiros passos da domesticação do arroz (Xu *et al.*, 2012). Estes fatos ressaltam a importância de estudos de genótipos de arroz vermelho e cultivado provindos do Rio Grande do Sul, para possibilitar o melhor entendimento local do caráter degrane. Neste mesmo sentido, há necessidade de verificação da existência da mutação G₂₃₇T, através do sequenciamento do gene *Sh4*. No entanto, o sequenciamento desta região é bastante difícil, pois o SNP localiza-se em uma região rica nas bases nitrogenadas guanina e citosina (GC), o que dificulta sua amplificação (Pratyush *et al.*, 2012).

Outros genes potenciais relacionados ao degrane foram apresentados através da técnica de mapa de haplótipos (Huang *et al.*, 2010). O genoma de 517 genótipos de arroz provindos da China foram fenotipados e sequenciados, o que mostrou haver sete possíveis genes relacionados ao degrane distribuídos nos

cromossomos dois, três, cinco, oito, dez, onze e doze (Huang *et al.*, 2010). Destes sete possíveis genes (*Os02g017090*, *Os02g0613200*, *Os04g04480900*, *Os05g0117300*, *Os09g053200*, *Os10g0137700* e *Os11g0462100*), seis foram avaliados por Nunes (2012) quanto à sua expressão na região entre o pedicelo e a flor de plantas de ecótipos de arroz vermelho e arroz cultivado. Neste estudo verificou-se que os genes *Os02g0613200*, *Os05g0117300* e *Os10g0137700* não foram expressos na região entre o pedicelo e a flor aos dez dias após a polinização (Nunes, 2012). Com relação aos genes *Os03g0745400*, *Os08g0512400* e *Os11g0148700*, houve expressão no momento e no tecido vegetal analisados (Nunes, 2012). No entanto, estes três genes não estão diretamente relacionados com o nível de degrane, pois apresentaram o mesmo padrão de expressão relativa em genótipos com diferentes níveis de degrane (Nunes, 2012).

Dois novos genes, *OsCel9D* e *OsXTH8*, são fortes candidatos ao envolvimento com o processo de degrane em *O. sativa* (Nunes, 2012). As enzimas codificadas por *OsCel9D* e *OsXTH8* estão relacionadas à quebra de ligações químicas que permitem desde uma nova conformação da parede celular até a degradação das mesmas, no entanto, o estudo realizado por Roberts *et al.*, (2002) não avaliou a relação destes genes com o processo de degrane em *O. sativa*. Posteriormente, os genes *OsCel9D* (sinônimo *OsGLU1*) e *OsXTH8* (sinônimo *OsXRT5*) foram avaliados quanto a sua expressão relativa em fenótipos contrastantes de degrane e apresentaram relação com o caráter em estudo (Nunes, 2012).

A expressão relativa do gene *OsCel9D* foi analisada em dois genótipos com alto degrane (AV 31 e AV 60) e dois genótipos de baixo degrane (Batatais e Lacassine) (Nunes, 2012). Observou-se maior expressão relativa em genótipos

com baixo nível de degrane, ou seja, verificou-se uma relação inversa entre o nível de expressão relativa e o nível de degrane das sementes (Nunes, 2012). Isto indica que a superexpressão deste gene reduziria o nível de degrane em espécies de *O. sativa*. O gene *OsCel9D* codifica uma proteína do tipo endo-1,4-beta-glucanase. No genoma do arroz, endo-1,4-beta-D-glucanases formam uma família gênica com 15 membros e cada um possui um padrão de expressão distinto em diferentes órgãos (Zhou *et al.*, 2006). Esta família possui papel importante nos processos de crescimento e desenvolvimento em plantas de arroz (Zhou *et al.*, 2006).

Com relação ao gene *OsXTH8*, as cultivares de arroz Batatais e Lacassine, que apresentam baixo nível de degrane, apresentaram expressão relativa inferior ao controle AV 60, que possui alto degrane (Nunes, 2012). O gene *OsXTH8* codifica uma enzima *xyloglucan endotransglycosylase/ hydrolase* que está relacionada com a clivagem de polímeros na parede celular (Rose *et al.*, 2002). O estudo da variação nucleotídica do gene *OsXTH8* realizado em 36 genótipos demonstrou apenas mutações no intron um do gene (Nunes, 2012). Verifica-se que na posição 540 a maioria dos genótipos apresentou o nucleotídeo citosina, somente seis genótipos apresentaram o nucleotídeo timina nesta posição (Nunes, 2012). Na posição 530 também foi verificada outra mutação, a maioria dos genótipos testados apresentaram o nucleotídeo adenina, enquanto que onze genótipos apresentaram o nucleotídeo guanina nesta posição (Nunes, 2012). No entanto estas mutações não parecem ter uma relação com o nível de degrane, pois elas estão presentes tanto em genótipos com degrane, quanto naqueles sem degrane (Nunes, 2012). Mesmo que o gene *OsXTH8* tenha apresentado envolvimento com o caráter de degrane, as mutações encontradas até o momento, não explicam os diferentes níveis de expressão do gene em questão.

Conforme os resultados apontados acima, os genes *OsCel9D* e *OsXTH8* podem de fato estar relacionados ao caráter de degrane em *O. sativa*. No entanto, mais estudos são necessários, já que o estudo realizado por Nunes (2012) avaliou apenas a expressão destes genes em dois genótipos com alto degrane (AV 31 e AV 60) e dois genótipos com baixo degrane (Batatais e Lacassine). Isto ressalta a importância de avaliar a expressão dos genes *OsCel9D* e *OsXTH8* em um número maior de indivíduos, que apresentam fenótipos contrastantes quanto ao caráter de degrane.

Os progressos recentes no estudo da característica do degrane, principalmente, aqueles relacionados aos aspectos genéticos e moleculares, podem facilitar o controle de arroz vermelho. Atualmente, propõe-se a adoção de técnicas moleculares para mitigar o caráter de degrane dos ecótipos de arroz vermelho. Já que eventos transgênicos na cultura do arroz podem ser inviabilizados através da ocorrência da introgressão genética, onde o gene inserido é transmitido para o genoma de populações daninhas (Gealy *et al.*, 2003). Este fato ocorreu com as cultivares de arroz resistentes à imidazolononas, pois estudos indicam que o fluxo gênico a partir de plantas de arroz resistentes é o fator preponderante da origem da resistência de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas no RS (Goulart, 2011). Isso faz da ocorrência da introgressão genética um processo indesejado, uma vez que pode dificultar o controle de plantas daninhas, porque o gene introgridido traz vantagens adaptativas devido à resistência a herbicidas. No entanto, a introgressão terá efeito benéfico se a característica inserida cause algum efeito negativo às plantas daninhas, ou seja, seleção negativa. O ponto chave é fazer com que a introgressão genética passe do status de indesejada para desejada.

Uma alternativa interessante seria o modelo de genes em série proposto por Gressel & Valverde (2009). Este modelo pode ser utilizado na transformação genética de cultivares de arroz, onde se inserem dois genes na planta, o gene de interesse mais o gene mitigante (Al-Ahmad *et al.*, 2004). O gene mitigante deve possuir efeito positivo ou neutro na planta cultivada e efeito negativo na planta daninha (Al-Ahmad *et al.*, 2006). O trabalho realizado por Gressel & Valverde (2009) sugere que genes de mitigação devem apresentar características como nanismo, baixo degrane, ausência de dormência secundária e suscetibilidade a herbicidas. Neste sentido, a característica de ausência de degrane poderia ser utilizada, já que nas plantas cultivadas ela é importante e nas plantas de arroz vermelho ela é indesejada devido à impossibilidade de dispersão e aumento do número de sementes de arroz vermelho no solo. Isto possibilitaria a mitigação do problema relacionado à transgenia e proporcionaria maior controle do arroz vermelho, pois ocasionaria problemas na perpetuação da planta daninha e evitaria a presença de plantas daninhas resistente a herbicidas (Gressel & Valverde, 2009). Assim, é necessário um melhor entendimento de como o degrane se comporta em ecótipos de arroz vermelho do Sul do Brasil, principalmente com relação a quais genes estão envolvidos neste processo.

2.4 Dormência

2.4.1 Característica adaptativa

A dormência das sementes é uma característica na qual sementes viáveis não apresentam germinação, mesmo sob condições ambientais favoráveis a este processo (Goggin *et al.*, 2010). Esta característica é um mecanismo evolutivo, que provém da adaptação das espécies às condições ambientais em que se reproduzem e permite a sobrevivência das sementes no solo, muitas vezes, por

longos períodos (Delouche *et al.*, 2007). O estado de dormência das sementes se caracteriza por baixa atividade metabólica e insensibilidade temporária aos sinais de promotores de crescimento (Graeber *et al.*, 2012).

A dormência está presente em grande parte das sementes das plantas superiores e tem evoluído de forma diferente entre as espécies através da adaptação ao ambiente predominante em que vivem (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Este mecanismo evoluiu de forma divergente, já que atualmente cada espécie pode responder a estímulos de início e superação da dormência de maneiras distintas, de acordo com a diversidade de climas e habitats nos quais estas plantas estão submetidas (Graeber *et al.*, 2012). Através desta adaptação, o momento da germinação pode evitar climas desfavoráveis para o estabelecimento da nova planta. A dormência é um recurso que além de permitir que as sementes fiquem viáveis no solo por longos períodos, também possibilita a germinação escalonada de indivíduos, visando a perpetuação da espécie (Gu *et al.*, 2006).

Nas plantas cultivadas de arroz a alta dormência das sementes normalmente é um caráter indesejável (Fogliatto *et al.*, 2010). Entretanto, algum grau de dormência torna-se vantajoso no desenvolvimento e maturação da semente, pois a total falta de dormência poderia culminar na germinação das sementes ainda na panícula, o que ocorre com maior facilidade em cultivos sob sistema irrigado ou devido à alta umidade relativa do ar no momento de maturação dos grãos e pode ocasionar grande perda na produção (Bewley, 1997; Fogliatto *et al.*, 2010). Durante os processos de domesticação de grande parte das culturas, através dos processos de seleção, foram removidos os mecanismos de dormência presentes nas sementes dos ancestrais silvestres (Kilian *et al.*, 2009).

As sementes das plantas daninhas frequentemente possuem elevada dormência que permite que as mesmas persistam no solo por alguns anos antes de iniciar a germinação (Li *et al.*, 2011). Este é um dos fatores que faz do arroz vermelho a planta daninha com maior importância na cultura arroz, pois além de permitir que as sementes permaneçam viáveis no solo, a dormência ocasiona a germinação, emergência, crescimento e desenvolvimento escalonado, o que dificulta o seu controle (Delouche *et al.*, 2007). Estas dificuldades ocorrem principalmente no manejo pós-semeadura da cultura, já que inviabiliza alguns métodos de controle ou tornam estas práticas bastante onerosas. Ainda, a falta de controle adequado desta planta daninha contribui para a reinfestação e a contínua realimentação do banco de sementes do solo.

A dormência das sementes de *Oryza sativa* vem sendo estudada há muitos anos (Gu *et al.*, 2003), mas os mecanismos de regulação da germinação e dormência são pouco conhecidos (Graeber *et al.*, 2012). Este mecanismo é considerado por alguns autores como o fenômeno menos compreendido no processo fisiológico das sementes (Gu *et al.*, 2003; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). A complexidade do assunto e escassa quantidade de materiais que descrevem os mecanismos de dormência das sementes em *O. sativa* faz com que haja a necessidade de apresentar as informações já obtida com outras espécies, para proporcionar o entendimento desta característica em *O. sativa*.

2.4.1.1 Dormência e germinação

Uma semente sem dormência tem a capacidade de germinar em ampla gama de condições ambientais (Baskin & Baskin, 1998; 2004). A germinação inicia-se com a absorção de água pela semente e termina com o alongamento do eixo embrionário (radícula) (Bewley & Black, 1994). Além do requisito básico de

água, oxigênio e temperatura apropriada, a semente também pode ser sensível a outros fatores, como a luz e/ou nitrato (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Na maioria das sementes a captação de água para a germinação é trifásica: Na fase I, chamada de embebição, ocorre uma absorção inicial rápida; Seguida por uma fase de platô, fase II; Na fase III finalmente ocorre um aumento adicional na absorção de água, que acontece quando o eixo embrionário alonga e rompe as camadas que envolvem a semente (Manz *et al.*, 2005). Assim, o sinal que evidencia que a germinação está completa é a formação e saída da radícula, que caracteriza o processo chamado de germinação visível (Bewley, 1997).

Praticamente todos os eventos metabólicos que ocorrem antes da conclusão da germinação em sementes sem dormência, também ocorrem em sementes dormentes embebidas (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Na verdade, em algumas sementes as atividades metabólicas podem ser apenas ligeiramente diferente das sementes sem dormência. Assim, uma semente dormente pode atingir praticamente todos dos passos metabólicos necessários para completar a germinação, mas por algum motivo desconhecido o eixo embrionário (radícula) não alonga (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Ainda, em muitas sementes isto ocorre quando há a presença de determinadas substâncias, como o ácido abscísico (ABA), que faz com que o embrião continue se desenvolvendo, mas não desenvolve a radícula (Nonogaki, 2006).

2.4.1.2 Classificação da dormência de sementes

O fato da dormência ser um caráter muito variável entre espécies e ainda ser uma característica quantitativa, cuja profundidade varia ao longo tempo (Graeber *et al.*, 2012), faz com que existam inúmeros tipos e classificações para este caráter. A dormência pode ser dividida em primária e secundária (Hilhorst,

1995; 1998). Dormência primária é induzida durante a fase de maturação da semente e atinge nível elevado em sementes recém colhidas, reduzindo lentamente durante o armazenamento. Condições específicas também podem reduzir a dormência, como por exemplo, altas ou baixas temperaturas por determinado período (Hilhorst, 1995; 1998). No entanto, ao invés de reduzir ao longo do tempo, a dormência também pode ser re-induzida ou passar a existir em sementes que antes não apresentavam dormência, este evento é chamado de dormência secundária (Hilhorst, 1995; 1998). A dormência secundária ocorre quando as condições para a germinação, como por exemplo luz, estão faltando (Hilhorst, 1998; Graeber *et al.*, 2012). Um estudo realizado no sul do Brasil avaliou cinco ecótipos de arroz vermelho e verificou que quando estes ecótipos foram enterrados a 30 cm de profundidade, quatro dos cinco ecótipos analisados apresentavam dormência secundária (Peske *et al.*, 1997). Acredita-se que a dormência secundária verificada aconteceu em função da pouca disponibilidade de luz encontrada aos 30 cm da superfície do solo (Peske *et al.*, 1997).

Outro sistema bastante aceito e utilizado na classificação da dormência das sementes foi proposto por Nikolaeva (1967) e reformulado por Baskin & Baskin (2004), que considera o fato de que a dormência é determinada por propriedades morfológicas e fisiológicas da semente (Graeber *et al.*, 2012). Com base nesse esquema, foi proposto uma classificação abrangente que inclui cinco classes de dormência: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e combinacional (Baskin & Baskin, 2004). No entanto esta classificação é pouco utilizada na descrição de *O. sativa* e por isto não será abordada no presente estudo.

A classificação mais comumente utilizada no arroz divide a dormência das sementes em duas categorias (Vieira & Barros, 1994). A primeira relaciona-se ao fato da semente não conseguir completar o processo germinativo, pois o embrião

tem seu crescimento limitado pelas estruturas físicas, mecânicas ou químicas do tegumento, pericarpo, pálea, lema ou glumas que envolvem o grão, também chamada de dormência exógena (Vieira & Barros, 1994). A segunda categoria deve-se a incapacidade do embrião germinar por si, devido a fatores fisiológicos, ou a imaturidade do embrião, a qual é reduzida com o aumento do tempo pós-colheita, chamada de dormência endógena (Vieira & Barros, 1994). Assim, a dormência endógena é causada por algum bloqueio da germinação relacionada ao próprio embrião ou tecidos. Quando a dormência envolve processos metabólicos é conhecida como fisiológica e, quando está relacionada às sementes com embrião não completamente desenvolvido é descrita como morfológica (Menezes *et al.*, 2009).

O arroz vermelho pode apresentar ambas as categorias de dormência (exógena e endógena) e em diferentes graus de ocorrência (Menezes *et al.*, 2009), o que faz com que as classificações percam um pouco a sua importância. Neste caso, as diferenças na categoria e grau de dormência não estão relacionadas apenas com as características genéticas das populações, biótipos ou mesmo cultivares de *O. sativa*, mas também às condições ambientais vigentes durante o desenvolvimento das sementes e à posição das cariopses na panícula (Delatorre, 1999). Neste sentido, além da variação de intensidade de dormência entre biótipos e conforme as condições ambientais, ainda pode haver variação em uma mesma planta, e na mesma panícula (Delatorre, 1999). Esta intensidade pode variar em questões de dias, ou até anos, o que torna este mecanismo de sobrevivência bastante eficiente, pois possibilita que pelo menos parte das sementes geradas germinem sob condições favoráveis ao seu estabelecimento (Delouche *et al.*, 2007).

Um dos fatores que contribui para agravar a intensidade de populações com características divergentes quanto à dormência das sementes é a ocorrência de cruzamentos naturais que acontecem entre o arroz cultivado e arroz vermelho (Noldin *et al.*, 1999; Menezes *et al.*, 2002). Isto contribui para aumentar a diversidade nas populações daninhas e favorece o aparecimento de ecótipos com comportamento e características similares às cultivares utilizadas nas lavouras orizícolas (Schawanke *et al.*, 2008). Além de dificultar as recomendações de manejo para o arroz vermelho (Noldin *et al.*, 1999), dificulta o estudo das características desta planta daninha, pois deve-se tomar o cuidado de que as populações de arroz vermelho em estudo, de fato apresentam as características desejadas em questão.

Um trabalho que avaliou ecótipos de arroz vermelho procedentes de lavouras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina verificou alta variabilidade quanto às características das sementes e à intensidade e duração da dormência (Shawanke *et al.*, 2008). Dos 16 ecótipos de arroz vermelho analisados neste trabalho, nove apresentaram sementes totalmente dormentes (100%) até os 30 dias após a colheita (DAC). Quatro ecótipos apresentaram suas sementes dormentes até os 60 DAC e outros três ecótipos apresentaram dormência até aos 150 DAC (Shawanke *et al.*, 2008). O trabalho realizado por Andres & Machado (2004) também afirmam que os diferentes ecótipos de arroz vermelho encontrados nas lavouras gaúchas apresentam variabilidade para as características morfológicas e fisiológicas, até mesmo em ecótipos provenientes da mesma região.

Diante destas informações é possível verificar a importância de conhecer as características das populações em estudo. Neste sentido, o presente trabalho deu importância e ênfase para a fenotipagem das cultivares de arroz, ecótipos de

arroz vermelho e espécie silvestre *O. glaberrima*, afim de verificar fenótipos contrastantes para o caráter de dormência. Pois tão importante quanto a análise genotípica é a análise fenotípica do caráter em estudo, que possibilita avaliar precisamente os processos existentes com base nos fenótipos contrastantes.

2.4.1.3 Causas da dormência em *Oryza* spp.

A dormência das sementes em *Oryza sativa* pode estar relacionada com a regulação hormonal, composição da semente, aspectos genéticos e moleculares (Graeber *et al.*, 2012). Vários dos tecidos que compõem a semente podem contribuir para o seu nível de dormência. Acredita-se inclusive que a casca das sementes de arroz impede a penetração de oxigênio para que se realize o processo germinativo e que, também a casca, consome o oxigênio deixando-o indisponível para o embrião (Bewley & Black, 1994). Outro fator bastante importante para a dormência das sementes está relacionado à questão hormonal. O papel dos hormônios ácido abscísico e ácido giberélico já foi reconhecido na regulação da dormência e germinação das sementes (Graeber *et al.*, 2012). Alguns estudos mostraram também que etileno e auxinas teriam fundamental importância no processo de germinação das sementes dormentes (Koornneef *et al.*, 2002; Gubler *et al.*, 2005). Contudo, atualmente acredita-se que os hormônios ácido abscísico (ABA) e giberelinas (GA) sejam as principais reguladores deste mecanismo (Liu *et al.*, 2011). Em particular, o equilíbrio entre os níveis destes dois hormônios e suas respectivas vias de sinalização são importantes na indução e manutenção da dormência assim como na promoção da germinação (Finkelstein *et al.*, 2008).

ABA pode inibir a germinação e sua acumulação correlaciona-se com o aparecimento da dormência (Liu *et al.*, 2011). Estudos genéticos têm mostrado

que ABA quando produzido por tecidos maternos ou exógenos não é suficiente para induzir a dormência, o que faz com que este tipo de dormência dependa da síntese de ABA no embrião e/ou endosperma (Finkelstein *et al.*, 2008). Na fase de enchimento dos grãos ocorre o acúmulo de ABA, e a ocorrência de germinação precoce é em geral associada a deficiências na síntese ou na sensibilidade ao ABA (Delatorre, 1999). A forma de ação deste fitormônio no mecanismo de dormência ainda não é totalmente compreendida, acredita-se que na presença deste hormônio a entrada de água na semente seja inibida (Welbaum *et al.*, 1990) ou ocorra ativação de determinados genes (Delatorre, 1999). Em sementes de arroz cultivado, em cultivares com alta dormência (PA64s) o teor de ABA nas foi o dobro daquele encontrado nas sementes de arroz com baixa dormência (9311) (Liu *et al.*, 2011). No entanto, os teores de ABA em arroz vermelho não foram avaliados até o momento. Assim, um dos genes selecionados para análise no presente estudo está relacionado ao catabolismo de ABA como forma de avaliação indireta da importância deste hormônio na dormência de sementes em arroz vermelho.

As giberelinas são conhecidas por estimular a germinação de sementes em várias espécies, principalmente nos cereais (Bewley, 1997). Em sementes de arroz verificou-se redução parcial da dormência com aplicação exógena de ácido giberélico, tendo seu efeito aumentado com o avanço da idade pós-colheita (Bewley, 1997). A dormência das sementes é menor em sementes com teores endógenos maiores deste composto (Liu *et al.*, 2011). Acredita-se que o ácido giberélico estimula a germinação através da indução de enzimas hidrolíticas que enfraquecem os tecidos, como endosperma e tegumento, fazem a mobilização de substâncias de reserva das sementes e estimulam a expansão do embrião (Finkelstein *et al.* 2008). Na última década foram identificados mais alguns fatores

que influenciam no caráter de dormência, incluindo genes específicos, fatores de cromatina e processos não enzimáticos (Finkelstein *et al.* 2008).

2.4.2 Aspectos genéticos e moleculares

A dormência das sementes é considerada um caráter genético complexo, controlado por múltiplos genes (QTLs), os quais são regulados em função das condições ambientais onde as plantas estão submetidas (Wan *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2011). Acredita-se que a intensidade e o período da dormência devem ser controlados por uma interação genética com o ambiente. No entanto, análises genéticas apontam presença de genes principais relacionados à dormência em acessos de arroz vermelho (Gu *et al.*, 2003). Estudos que analisaram geneticamente a dormência em arroz, usando QTLs, mostraram que *loci* que controlam esta característica estão presentes em todos os cromossomos de arroz (Lin, *et al.*, 1998; Cai & Morishima, 2000; Miura *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011).

Atualmente há registros de 164 QTLs associados à dormência das sementes de arroz descritos como *loci qSD, qDOR, Sdr, sd, ou sQD*, que podem ser encontrados no banco de dados referente à QTLs do família Poaceae (www.gramene.org/qtl/index.html). Um número considerável destes QTLs também está relacionado a outras características do arroz vermelho, como debulha natural das sementes, comprimento da arista, cor do pericarpo e da casca do grão (Ji *et al.*, 2006). Acredita-se inclusive que as características de cor do pericarpo, degrane, dormência e longevidade das sementes são caracteres inseparáveis, pois quando realizado mapeamento os respectivos *locus* mostram-se muito próximos, de tal modo que estas características são referidas como um bloco de domesticação, algumas destas podem ser inclusive controladas por um único

locus (Finkelstein *et al.*, 2008). Contudo, poucos QTLs relacionados à dormência foram mapeados com precisão. Dentre estes, tem-se o *locus Sdr1*, que encontra-se no braço curto do cromossomo três e outro, *qSD12*, localizado no braço longo do cromossomo 12 (Takeuchi *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2010). Outros quatro QTLs (*qGR2*, *qGR5*, *qGR6* e *qGR10*) foram apontados como fatores relacionados a dormência das sementes (Li *et al.*, 2011b). Estes QTLs estão localizados respectivamente nos cromossomos dois, cinco, seis e dez e foram identificados através do estudo de um conjunto de 143 linhagens de arroz (*O. sativa*), cada uma contendo pequenos fragmentos de uma variedade japônica – Nipponbare, e uma uniformidade genética de uma variedade indica – Zhenshan97 (Li *et al.*, 2011b).

Recentemente foram relatados estudos sobre os genes *OsCYP707A5* (Liu *et al.*, 2011), *OsMADS29* (Li *et al.*, 2011) e *Sdr4* (Sugimoto *et al.*, 2010). Através dos resultados encontrados nestes trabalhos é possível considerar estes três genes como possíveis candidatos a desempenhar algum papel nos mecanismos de dormência das sementes do arroz vermelho. O gene *OsCYP707A5* pode ocasionar variações funcionais nos estados de dormência de sementes reguladas por ácido abscísico (ABA) e ácido giberélico (GA) (Liu *et al.*, 2011). Já o gene *OsMADS29* apresentou expressão elevada em espiguetas e panículas, e pouca expressão em brotos, folhas e raízes. Este gene pode estar relacionado com a ausência do caráter de dormência, pois é expresso preferencialmente durante a maturação e germinação das sementes (Li *et al.*, 2011). O gene *Sdr4*, foi identificado no braço longo do cromossomo sete, e observou-se contribuição substancial deste QTL para as diferenças de dormência entre as cultivares Nipponbare (japônica) e Kasalath (indica) (Sugimoto *et al.*, 2010). No entanto, verificou-se a expressão destes genes apenas em determinadas etapas no

desenvolvimento da semente. O presente estudo visou avaliar conjuntamente a expressão relativa dos genes *OsCYP707A5*, *Sdr4* e *OsMADS29* em etapas fisiológicas distintas da semente, de forma a verificar o comportamento destes genes desde a formação do embrião até a germinação visível, e apontar o possível papel no caráter de dormência das sementes em arroz vermelho.

Vários fatores fisiológicos estão envolvidos na taxa de germinação das sementes. Estes fatores incluem o enfraquecimento da parede celular ou do endosperma periférico e podem ocasionar a decomposição ou síntese de alguns componentes armazenados na semente (Nonogaki, 2006). Outros fatores podem funcionar como reguladores, como é o caso dos hormônios ABA e GA (Koornneef *et al.*, 2002). A deficiência de ABA durante o desenvolvimento de sementes está associada com a ausência de dormência primária em sementes maduras, por isso este fitormônio é conhecido por desempenhar um papel na indução da dormência (Gu *et al.*, 2010). A superexpressão de genes de biossíntese de ABA pode aumentar o conteúdo de ABA nas sementes e aumentar a dormência nas mesmas, e assim, ocasionar demora na germinação (Liu *et al.*, 2011). ABA desempenha importante papel em muitos processos celulares, incluindo o desenvolvimento da semente, dormência e germinação, crescimento vegetativo e respostas aos estresses ambientais (Koornneef *et al.*, 2002). Sendo que a diminuição na quantidade de ABA e aumento na sensibilidade de GA ocasiona a transição do estado dormente ao estado não dormente da semente (Liu *et al.*, 2011).

As principais enzimas envolvidas no metabolismo de ABA e GA foram identificadas (Seo *et al.*, 2006). Verificou-se que genes catabólicos *CYP707A* codificam a ABA 8'-hidroxilase (Seo *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2006; Yang & Guo, 2007). Liu *et al.* (2011) verificaram que o arroz possui três *CYP707A*, destes

três, o gene *OsCYP707A5* apresenta maior importância. Mais especificamente, foi verificado dois *Indels* de 306 pb na sequência codificadora e dois *Indels* de 260 pb a montante da região reguladora do *OsCYP707A5*, nas diferentes cultivares de arroz analisadas. Estes resultados apontaram que as variações *Indels* na sequência de nucleotídeos do gene *OsCYP707A5* podem ocasionar variações funcionais e variações nos estados de dormência de sementes reguladas por ABA e GA (Liu *et al.*, 2011).

Com relação ao gene *OsMADS29* (Loc_Os02g07430), através da análise da F2 provinda de um cruzamento de uma variedade japônica (alta dormência) com uma variedade indica (baixa dormência), confirmou-se a relação do *qGR2* com a ausência do caráter de dormência e identificaram-se três genes putativos (Loc_Os02g07410, Loc_Os02g07420 e Loc_Os02g07430) presentes neste QTL (Li *et al.*, 2011b). Os genes Loc_Os02g07410 e Loc_Os02g07420 não foram expressos durante a germinação de sementes, em nenhuma das linhagens estudadas. Com relação ao Loc_Os02g07430 (*OsMADS29*), verificou-se expressão elevada do mesmo em espiguetas e panículas e pouca expressão em brotos, folhas e raízes, indicando que o gene, está relacionado com o caráter de dormência das sementes, pois é expresso preferencialmente durante a maturação e germinação das sementes (Li *et al.*, 2011a). Este mesmo trabalho desenvolveu um marcador (RM 12532), associado com este gene relacionado à dormência em arroz (Li *et al.*, 2011a).

O gene *Sdr4* apresentou contribuição substancial para as diferenças de dormência entre as cultivares Nipponbare (japônica) e Kasalath (indica) (Sugimoto *et al.*, 2010). A cultivar japônica possui apenas o alelo Nipponbare (*Sdr4-n*) e apresenta dormência reduzida. Já o grupo indica, que possui tanto o alelo Kasalath (*Sd4-k*) quanto o alelo *Sdr4-n*, apresenta dormência das sementes mais

pronunciada. Considerando que *Srd4-k* também é encontrado no ancestral *O. rufipogon*, enquanto *Sdr4-n* parece ter sido originado de pelo menos dois eventos de mutação do alelo presente nesta espécie ancestral, acredita-se que *Sdr4* possa estar envolvido no processo de domesticação do arroz (Sugimoto *et al.*, 2010). *Sdr4* codifica uma nova proteína, que apresenta sequência de aminoácidos que não tem similaridade com proteínas de funções conhecidas. A expressão do *Sdr4* é regulada por *OsVP1*, que regula o potencial de dormência das sementes e reprime a expressão de genes de germinação, sugerindo que *Sdr4* atua como um regulador intermediário de dormência no programa de maturação das sementes (Sugimoto *et al.*, 2010). Outro trabalho que também realizou estudo do gene *Sdr4* avaliou uma população da espécie *O. sativa*, composta por 240 linhagens recombinantes (Li *et al.*, 2011a). Neste trabalho foi encontrado que este gene está localizado na região *qDGR7*, exatamente entre os marcadores RM70 e R1245, no cromossomo sete e que sua expressão apresenta importância para o caráter de dormência das sementes (Li *et al.*, 2011a).

Através dos estudos apresentados até o momento é possível observar a diversidade de informações relacionadas à característica da dormência. No entanto, estas informações são ainda pouco concisas, em função da complexidade deste caráter a começar pelo fato de que a dormência é geralmente medida de forma indireta, e pela utilização apenas da taxa de germinação. Isto gera inúmeros entraves para o entendimento deste caráter, pois muitas vezes características como dormência primária e secundária são totalmente ignoradas nos estudos e não utiliza-se um padrão metodológico para o estudo desta característica. Além disso, a dormência fisiológica das sementes é um mecanismo evolutivo, que provém da adaptação das espécies as condições ambientais (Delouche *et al.*, 2007) e permite assim que cada espécie ou até mesmo planta,

desenvolva mecanismos distintos, conforme o ambiente que estão inseridas. Estes fatos remetem à necessidade de mais estudos focados a este assunto, a fim de melhor compreender a dormência das sementes em arroz vermelho. Pela complexidade e diversidade do caráter faz-se necessário inicialmente a identificação de populações que apresentam níveis de dormência contrastantes. Embora já exista algum conhecimento da regulação gênica da dormência de sementes em arroz cultivado, poucas informações desta natureza são existentes para o arroz vermelho. O presente trabalho propôs-se a investigar a expressão dos genes *OsCYP707A5*, *OsMADS29* e *SDR4* desde a formação do embrião até a germinação visível, e apontar o possível papel destes genes no caráter de dormência das sementes. O melhor entendimento dos vários genes envolvidos neste mecanismo proporciona conhecimentos específicos, que associados aos resultados de estudos fisiológicos deste processo, poderão oferecer informações detalhadas para o desenvolvimento de estratégias de controle para esta planta daninha. Como por exemplo, técnicas de modelo de genes em série com utilização de gene mitigante, citado do item 2.3.3 do degrane podem também ser utilizadas tendo a dormência como caráter de utilização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório da Flora Ruderal (LAFLOR), no Laboratório de Fisiologia Vegetal e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre/RS. Os estudos foram divididos em duas etapas principais, a primeira está relacionada ao degrane, descrita no item 3.1, e a segunda está relacionada à dormência das sementes, descrita no item 3.2.

3.1 Degrane

3.1.1 Material vegetal

O material vegetal constituiu de nove cultivares de arroz, sete ecótipos de arroz vermelho e *O. glaberrima*, que neste trabalho será considerada espécie silvestre (Tabela 1). Estes genótipos foram escolhidos a partir de trabalhos anteriores que avaliaram o degrane em 18 cultivares de arroz, 16 ecótipos de arroz vermelho e duas espécies silvestres, em duas safras (2008/2009 e 2010/2011) (Nunes, 2012). Para possibilitar o estudo da expressão de genes relacionados ao degrane foram escolhidos genótipos com baixo, médio e alto degrane, que apresentaram comportamento semelhante nas safras 2008/2009 e 2010/2011, a partir dos resultados obtidos por Nunes, (2012) (Tabela 1).

TABELA 1. Denominação, tipo, espécie, fornecedor, origem e nível de degrane conforme Nunes, (2012) dos genótipos analisados no estudo de degrane. Porto Alegre, RS, 2013.

Genótipo	Tipo	Espécie	Fornecedor/ Origem	Degrane (Nunes, 2012)
AV 04	daninho	<i>O. sativa</i>	IRGA RS/BR	alto
AV 31	daninho	<i>O. sativa</i>	IRGA RS/BR	médio
AV 53	daninho	<i>O. sativa</i>	IRGA RS/BR	alto
AV 60	daninho	<i>O. sativa</i>	IRGA RS/BR	alto
AV 109	daninho	<i>O. sativa</i>	IRGA RS/BR	alto
AV 172	daninho	<i>O. sativa</i>	IRGA RS/BR	alto
AV 503	daninho	<i>O. sativa</i>	IRGA RS/BR	alto
Cica 08	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	EPAGRI SC/ BR	médio
Batatais	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	EPAGRI SC/ BR	baixo
EEI 23	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	EPAGRI SC/ BR	baixo
EEI 31	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	EPAGRI SC/ BR	baixo
Empasc 100	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	EPAGRI SC/ BR	baixo
Epagri 109	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	EPAGRI SC/ BR	médio
IRGA 417	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	IRGA RS/ BR	médio
Lacassine	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	EPAGRI SC/ BR	médio
Nipponbare	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>japonica</i>	EPAGRI SC/ BR	baixo
Glaberrima	silvestre/ cultivado	<i>O. glaberrima</i>	UFRGS RS/ BR	baixo

Inicialmente as sementes foram submetidas a condições ideais para o processo de germinação, conforme método descrito por Zhang *et al.* (2004). As sementes foram colocadas em papel germinador com tamanho de 25 x 40 cm, fechados na forma de rolos e posicionados verticalmente em recipiente com capacidade de 1000 mL. Uma lâmina de água destilada com aproximadamente 20 mm foi preservada em cada recipiente. As sementes foram mantidas em câmara de germinação sob temperatura de 25°C por cinco dias. No dia 27/11/2011 quando as sementes apresentavam radícula maior que 1 mm foi realizado o transplante para tanques de concreto com dimensão de 1,20 x 1,10 x 0,80 m, que continham solo hidromórfico classificado como gleissolo, localizados no LAFLOR. As sementes foram dispostas em linhas de 1,0 m de comprimento, com espaçamento entre linha de 25 cm, e, com densidade de 50 plantas por metro linear. A adubação do solo e o manejo das plantas foram realizados conforme recomendações SOSBAI (2010). Inicialmente a irrigação foi realizada através da manutenção do solo saturado. Quando as plantas atingiram o estágio de quatro

folhas a irrigação foi realizada pela manutenção de lâmina de água de 6 cm através de um sistema de boias. A adubação de cobertura foi de 40 kg ha⁻¹ de N no início da diferenciação do primórdio floral. O controle de doenças e pragas foi realizado com o fungicida azoxystrobin e o inseticida malationa, nas doses de 100 e 500 g i.a ha⁻¹, respectivamente.

3.1.2 Avaliação fenotípica do degrane em populações de *Oryza spp.*

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado com quatro repetições. O nível de degrane foi avaliado em quatro panículas por genótipos e cinco grãos da parte mediana de cada panícula. As análises foram realizadas quando as plantas encontravam-se no início da maturação dos grãos. Foi considerada planta madura aquela que apresentava visualmente mais de dois terços de suas panículas totalmente dobradas e suas sementes resistentes à pressão da unha. O nível de degrane foi realizado através da determinação quantitativa da “Resistência à Tensão de Ruptura” (RTR). A RTR foi determinada por meio de um medidor de força digital (Modelo FGV-Digital Force Gauge – DART 2.0, SHIMPO). Um gancho foi conectado ao aparelho, de forma a envolver o grão de arroz. Após, foi realizado o tensionamento do aparelho no sentido vertical até que o grão fosse despreendido da panícula. O equipamento registra a força em gramas que correspondente a RTR. Quanto maior o valor da RTR, menor o nível de degrane do grão.

Os dados foram analisados através da análise da variância (Apêndice 1), quando significativo, aplicou-se o teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre médias através do programa SAS 9.0 (SAS Institute, 2004). A expressão dos resultados foi realizada de forma gráfica através da média e do desvio padrão de

cada genótipo avaliado. Os gráficos foram gerados com o uso do programa Sigmaplot 12.0.

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

O presente trabalho constou da avaliação da expressão relativa de genes relacionados à parede celular, *OsXTH8* e *OsCel9D*, e do gene *Sh4*, que possui ação comprovada sobre o degrane (Ji *et al.*, 2006), através da utilização de técnica de RT-PCR em tempo real. Com base em estudos realizados por Nunes (2012) foram escolhidos dois genes com possível relação com o caráter de degrane, *OsXTH8* e *OsCel9D*. Estes genes foram associados ao degrane em dois genótipos com alto degrane (AV31 e AV60) e dois genótipos com baixo degrane (Batatais e Lacassine) (Nunes, 2012). O gene *Sh4* foi escolhido devido a resultados controversos na literatura (Li *et al.*, 2006b; Akasaka *et al.*, 2011; Nunes, 2012; Zhu *et al.*, 2012). Os genótipos utilizados para este estudo foram os mesmos utilizados para a fenotipagem (Tabela 1).

3.1.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O estudo da expressão foi realizado na região de ligação da flor com o pedicelo. O material coletado consistiu de aproximadamente 1 mm da região do pedicelo e de 1,5 mm da região da flor (Figura 1B). A definição desta região foi determinada em função de trabalhos da literatura que determinaram a expressão de genes na zona de abscisão que corresponde a esta estrutura anatômica (Ji *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006b). A obtenção deste material foi realizada para os genótipos descritos no item 3.1.1. As panículas foram marcadas com uma fita no dia em que ocorreu a antese na parte mediana da panícula (Figura 1A). Dez dias

após foi realizada a coleta do material através do corte da estrutura desejada, com lâminas descartáveis de metal e auxílio de régua. O procedimento era realizado com materiais esterilizados, para evitar a contaminação com RNase. Imediatamente após o corte o material vegetal foi depositado em nitrogênio líquido (LN₂). Em cada panícula foram coletadas 30 junções pedicelo-flor da parte mediana da panícula, equivalente a 30 mg de material vegetal, que correspondeu a uma repetição. Cada genótipo contou com três repetições.

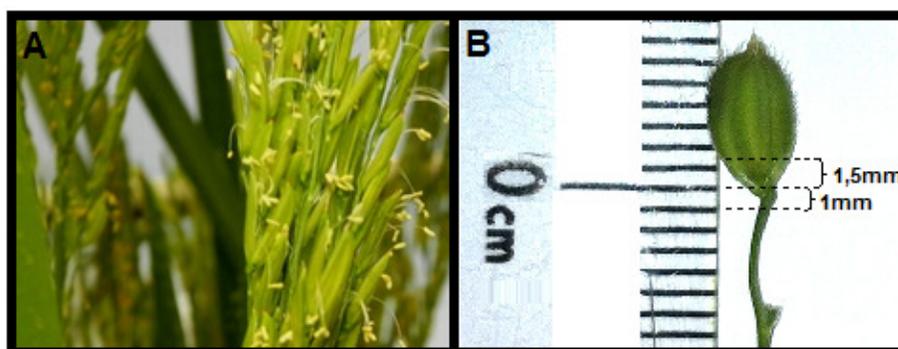


FIGURA 1. Parte mediana da panícula apresentando antese (A). Região de estudo da expressão dos genes relacionados ao degrane, ligação da flor (1,5 mm) com o pedicelo (1 mm) (B). Porto Alegre, RS. 2013

A extração do RNA foi realizada pelo método Trizol®. Inicialmente, o material vegetal foi macerado em LN₂, e imediatamente após foi adicionado 300 µL do reagente Trizol® (Invitrogen). Os tubos foram agitados no vortex por 15 seg duas vezes. Após, as amostras foram centrifugadas a 11.180 g durante 15 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml. Em seguida 60 µL de clorofórmio foi adicionado a cada tubo, que foi agitado vigorosamente em vortex durante 15 seg. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente durante 5 min e centrifugados a 11.180 g durante 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml. Neste momento foi adicionado a solução precipitadora de RNA (0,8 M citrato de sódio e 1,2 M NaCl) e isopropanol gelado, na quantidade correspondente a metade do

volume da fase aquosa transferida para o novo tubo. Após os tubos foram invertidos gentilmente para misturar a solução, e foram incubados durante 10 min em temperatura ambiente. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 11.180 g durante 15 min a 4°C para formação do precipitado. O sobrenadante oriundo deste processo foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, agitado brevemente no vortex e centrifugado a 7.155 g durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco durante 10 min em estufa com circulação de ar seco a 35°C. Finalmente, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água livre de RNase, incubado durante 10 min a 60°C, centrifugado a 7.155 g durante 5 min a 4°C (para precipitar o material insolúvel) e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (Genesys 2™, Thermo Spectronic), em comprimento de onda de 260 nm e diluído em água livre de RNase a 1 µg µL⁻¹. Cada amostra foi incubada com DNase® I (Invitrogen) em uma quantidade de 3 µg de RNA total, conforme recomendações do fabricante.

A etapa seguinte constou da obtenção da fita de cDNA que corresponde a fita complementar de DNA, a partir do RNA, com a utilização da transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen). Nesta etapa utilizaram-se os tubos de 0,2 mL contendo 1 µg de RNA total, purificado na etapa anterior. Os tubos foram mantidos no gelo e adicionou-se a cada tubo 1 µL do mix primers-oligo (dT) (50 µM), 1 µL dNTPs Mix (10 µM de cada nucleotídeo) e água MiliQ para completar o volume total de 14 µL. Em seguida os tubos foram agitados no vortex por 15 seg e incubados por 5 min a 65°C em termociclador Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf). Posteriormente foram incubados em gelo durante pelo menos 1 min. Após foi adicionado a cada tubo 4 µL 5X First-Strand Buffer, 1 µL 0,1 M DTT e 1 µL de SuperScript® III RT (200 units/ µL). Os tubos foram invertidos gentilmente

para misturar a solução e foram incubados por 50 min a 50°C em termociclador. Em seguida a reação foi inativada por aquecimento a 70°C durante 15 min.

3.1.3.2 Primers utilizados

Os *primers* utilizados foram sintetizados conforme sequência nucleotídica descrita por Nunes (2012). Na Tabela 2 encontram-se as sequências dos *primers*, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado.

TABELA 2. Sequências dos *primers* utilizados para RT-PCR em tempo real, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado.

Gene	Primer	Sequência (5'→3')	T _m ¹	Fragmento esperado (pb)
Genes relacionados à parede celular				
<i>OsCel9D</i>	Os03g0329500_F	TTGGCCATATCCGTGATACC	60,6	211
	Os03g0329500_R	TCTGAACAAGCATGGCACTC	60,0	
<i>OsXTH8</i>	Os08g0237000_F	CCATCCATTTCGTTCTCCATT	59,8	196
	Os08g0237000_R	GTGCTCACTTGCTCAGCATC	59,7	
Gene relacionado ao degrane				
<i>Sh4</i>	<i>Sh4</i> SNPd_F	GAGAGCACCTCGGAGAGC	59,7	220
	<i>Sh4</i> SNPd_R	ACCAGTGCAATGACAAGTGG	60,0	
Genes constitutivos testados				
Actin 2	Actin_F	TTTCCAAGGGTGAGTATGATGAG	79	124
	Actin_R	ACACAGGACACAAAAGCCAATA		
28s rRNA	28s rRNA_F	CTGATCTTCTGTGAAGGGT	84	151
	28s rRNA_R	TGATAGAACTCGTAATGGGC		
GADPH	GADPH_F	CTTTGTTGGTGACAGCAGG	82	149
	GADPH_R	GGACAGAGGCAATGTACC		

¹Temperatura em °C de pareamento do *primer*.

²Temperatura em °C do amplicon.

3.1.3.3 Reação de RT-PCR em tempo real

A análise da amplificação em tempo real foi realizada em equipamento 7300 *Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems) em placas contendo 96 poços *PCR-96M2 – HS – C*® (Axygen) com selador *MicroAmp*® *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems). As amostras sintetizadas de cDNA foram diluídas na

proporção de 1:100 (cDNA: água destilada), as quais foram utilizadas em quadruplicata. Como controle endógeno da PCR Tempo Real, foram testados os genes constitutivos GAPDH, *Actin* e 28 S rRNA (Tabela 2). Após estes testes, foi realizada a escolha do gene 28S rRNA para utilização como controle endógeno. O controle negativo consistiu da substituição do cDNA por água.

As reações foram realizadas com base no seguinte protocolo: 10 µL da amostra de cDNA (diluída 1:100) em água MiliQ; 10 µL dos constituintes da reação composta de 2 µL tampão 10X, 0,5 µL dNTPs (10 µM de cada nucleotídeo), 1,2 µL de solução de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de SYBR Green® (Invitrogen) diluído em 1:100 (preparado no momento da utilização a partir de solução diluída 100X e utilizado na ausência de luz para evitar a fotodegradação), 0,2 µL de ROX Reference Dye, 0,1 µL Taq Platinum® (Invitrogen) e 0,4 µL da combinação de *primers forward* e *reverse*, totalizado um volume final de 20 µL por reação. As reações foram sujeitas a um ciclo inicial de 95°C durante 5 min, seguido de uma sequência de 40 ciclos: iniciado com 94°C por 15 seg, 60°C por 10 seg, 72°C por 15 seg e 60°C por 35 seg, e um ciclo final de desnaturação de 95°C por 15 seg, 60°C por 60 seg, 95°C por 15 seg e 60°C por 15 seg.

3.1.3.4 Análise da reação RT-PCR em tempo real

A quantificação relativa foi realizada pelo ajuste das curvas pela análise da eficiência da PCR através do software LinRegPCR (versão12.2), que analisa a curva exponencial de amplificação. Valores de R>0,99, com eficiência entre 1,8 e 2 e números de pontos maiores que 4 foram aceitos, e os demais foram descartados não entrando na análise (Tuomi *et al.*, 2010). O valor *threshold* para cada *primer* foi ajustado manualmente, através da determinação da posição satisfatória para todas as amostras, considerando a amplificação na fase

exponencial, e na faixa de valores de ΔRN 30.000 e 50.000 (Tuomi *et al.*, 2010). Posteriormente, calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada tratamento.

A análise estatística foi realizada considerando os valores das quadruplicatas de Ct (Tuomi *et al.*, 2010). A análise dos dados constou da obtenção dos valores de Ct e realização das médias das amostras em quadruplicatas. Esta análise foi realizada através da fórmula de (Dussault & Pouliot, 2006), onde o $\Delta\Delta Ct = (Ct_{alvo} - Ct_{28S}) - (Ct_{calibrador} - Ct_{28S})$, sendo o $\Delta\Delta Ct$ a expressão relativa do gene, onde a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ fornece a dimensão de variação.

3.1.4 Análise da variabilidade nucleotídica do gene *Sh4*

Alguns dos genótipos fenotipados foram analisados quanto à variabilidade nucleotídica do gene *Sh4*. Com base na análise fenotípica realizada no item 3.1.1, foram escolhidos quatro genótipos (AV 503, Batatais, Glaberrima e Nipponbare), que apresentam níveis contrastantes de deigrane, para analisar a presença ou ausência da mutação G₂₃₇T no gene *Sh4* descrita por Li *et al.*, (2006b)

3.1.4.1 Extração de DNA

As amostras de DNA genômico foram obtidas de aproximadamente 150 mg de tecido foliar jovem, dos quatro genótipos citados acima. O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de folhas jovens de plantas individuais através do protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) modificado (Doyle & Doyle, 1987).

O material vegetal foi macerado na presença de nitrogênio líquido (LN₂) e acondicionado em microtubos de 1,5 mL previamente resfriados. Em cada tubo foi

adicionado 500 μL de tampão de extração (0,1 M Tris-HCl [pH 8,0], 0,02 M EDTA [pH 8,0], 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 1%), seguido por agitação vigorosa de 25 seg no vortex. Posteriormente, os tubos foram incubados a 65°C por 30 min em banho-maria, com agitação manual dos tubos a cada 10 min. Após esta etapa, foi adicionado a cada tubo 500 μL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados manualmente por 5 min e foram centrifugados a 11.180 g por 5 min para a formação do sobrenadante, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml e recebeu a quantidade de 75 μL de RNase (100 mg ml^{-1}). Em seguida os tubos foram incubados a 37°C durante 60 min. Após esta etapa, o DNA foi precipitado com 300 μL de álcool isopropanol gelado, seguidos de leve agitação, ou seja, os tubos foram invertidos gentilmente para misturar a solução. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 30 min a 18.800 g para formação do precipitado, após a centrifugação o sobrenadante oriundo deste processo foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Após o descarte do etanol o precipitado foi secado em temperatura de 35°C por 20 a 30 min e ressuspendido em 30 μL de TE 0,1X. O DNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro Genesys 2® (Thermo Spectronic) e diluído a 25 ng μL^{-1} .

3.1.4.2 Amplificação das regiões a serem sequenciadas

A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em termociclador PTC100® (MJ Research). No entanto existiram algumas dificuldades para a amplificação da região do exon um do gene *Sh4*. No presente estudo foram avaliados diferentes *primers*, temperaturas, ciclos e composição da reação de amplificação com o objetivo de isolamento do fragmento desejado. No entanto, estes procedimentos não resultaram na obtenção do produto desejado. A região

onde está localizado o SNP de interesse é uma região rica em bases nitrogenadas guanina e citosina, o que dificulta sua amplificação. O presente estudo obteve sucesso na amplificação desta região com o uso da enzima TaKaRa LA Taq[®] com GC Buffer. Esta é uma enzima utilizada para amplificação do DNA especificamente de segmentos com elevado teor de GC ou sequências repetidas.

A reação de cadeia de polimerase consistiu de 20 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada *primer*, 1x PCR buffer GC, 0,8 µM dNTPs, 1,25 U de TaKaRa LA Taq[®], 0,2 µL de DMSO e água miliQ em um volume total de 20 µL. O protocolo de reação consistiu de 3 min de incubação a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min para desnaturação da fita de DNA; 55°C por 1 min, para o pareamento dos *primers*; 72°C por 1,5 min para extensão da fita de DNA e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min. Os *primers* utilizados foram os mesmos descritos e sintetizados por Nunes (2012), no entanto com algumas alterações na combinação dos *primers forward e reverse* (Apêndice 5). Na Tabela 3 encontram-se as sequências dos *primers* utilizados, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado. Primeiramente a reação foi testada apenas na cultivar Nipponbare. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Sete conjuntos de *primers* foram testados (Tabela 3), e todos apresentaram amplificação satisfatória e bandas com tamanho esperado (Figura 2). No entanto, a reação não foi específica, pois houve a formação de outras bandas além da banda esperada (Figura 2). Avaliações com diferentes temperaturas de pareamento dos *primers* também não melhoraram a especificidade da reação. Assim, o fragmento desejado foi isolado a partir da extração do gel da banda do tamanho esperado, e o conjunto de *primers* escolhidos para utilizar no sequenciamento foi o conjunto *Sh4 Pair G*, que dentre

os conjuntos testados, foi o que mostrou-se mais específico (Figura 2). A purificação foi realizada a partir do gel de agarose 2%, com a utilização do kit PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), o protocolo foi realizado conforme informações do fabricante. A quantificação foi realizada através do espectrofotômetro Genesys 2® (Thermo Spectronic). Após, cada amostra foi diluída para a concentração de 25 ng μL^{-1} .

TABELA 3. Sequências dos *primers* utilizados para sequenciamento do gene *Sh4*, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado (Nunes, 2012).

Nome	Combinação <i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	T _m ¹	Fragmento esperado (pb)
<i>Sh4</i> <i>Pair A</i>	Primer A_F Primer A_R	TCGCGGAGGAGGTTGTCCCA ATGTCGGGCTCCTCTGCCGA	59,5 59,7	422
<i>Sh4</i> <i>Pair B</i>	Primer B_F Primer A_R	TGCACTGGTTCTGGCTGCGG ATGTCGGGCTCCTCTGCCGA	59,9 59,7	394
<i>Sh4</i> <i>Pair C</i>	Primer C_F Primer C_R	AGCCGTTCTTCCAGCAGTAG CTCAGCTTGCCTTGGCTCT	59,7 60,8	447
<i>Sh4</i> <i>Pair D</i>	Primer C_F Primer D_R	AGCCGTTCTTCCAGCAGTAG ACACCAAACGCCTCAGCTT	59,6 60,8	458
<i>Sh4</i> <i>Pair E</i>	Primer E_F Primer D_R	CCACTTGTCATTGCACTGGT ACACCAAACGCCTCAGCTT	59,6 60,8	493
<i>Sh4</i> <i>Pair F</i>	Primer E_F Primer A_R	CCACTTGTCATTGCACTGGT ATGTCGGGCTCCTCTGCCGA	59,6 60,8	403
<i>Sh4</i> <i>Pair G</i>	Primer G_F Primer A_R	GCCGTTCTTCCAGCAGTAGT ATGTCGGGCTCCTCTGCCGA	59,5 60,8	367

¹ Temperatura em °C de pareamento do *primer*

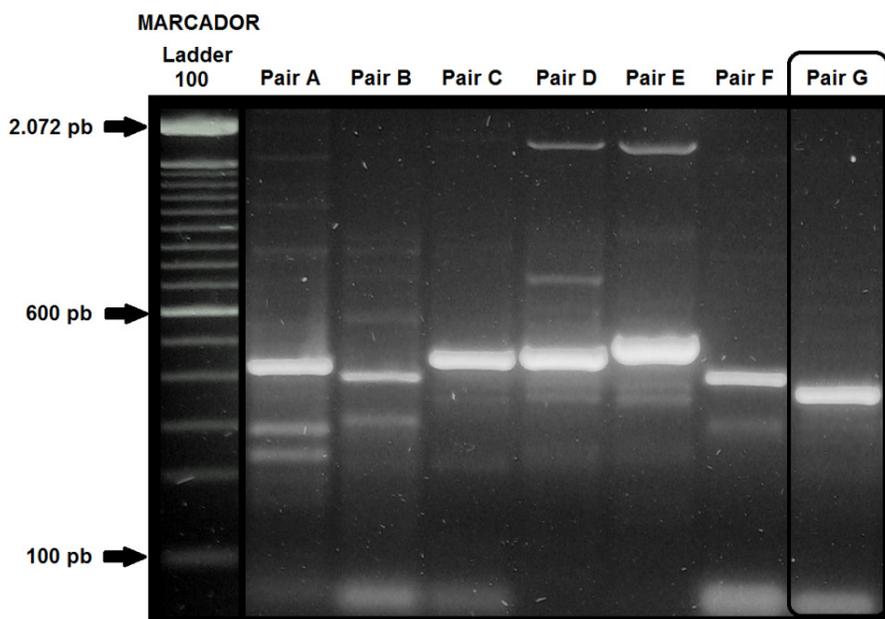


FIGURA 2. Gel de agarose 2% com as bandas resultantes da amplificação do gene *Sh4* com conjuntos de *primers* testados na cultivar de arroz Nipponbare. Marcador *Ladder* 100 pb (Invitrogen); Pair A, B, C, D, E, F e G. Porto Alegre, RS. 2013.

3.1.4.3 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer® que possui capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

3.1.4.4 Alinhamento

As sequências obtidas foram editadas pelo programa BioEdit (versão 7.0.5.3) (Hall, 1999). Após, foram alinhadas através do ClustalW, e o alinhamento foi feito utilizando a ferramenta BLASTn, com base na sequência AL606619 do gene *Sh4*, previamente depositada nos banco de dados *GenBank* e *Gramene*.

3.2 Dormência

3.2.1 Material vegetal

O material vegetal constituiu de duas cultivares de arroz, sete ecótipos de arroz vermelho e uma espécie silvestre, *Oryza glaberrima* (Tabela 4). As sementes foram colhidas na safra de 2008/09 no momento em que atingiram o ponto médio de maturação, que corresponde à umidade dos grãos entre 20 e 25%. Em fevereiro de 2009 aproximadamente 200 sementes por repetição foram acondicionadas em sacos de pano (tule), com tamanho de 15 x 15 cm, fechados individualmente. Para facilitar o momento da retirada das sementes do solo os sacos foram interligados por um barbante com 2 m de comprimento.

TABELA 4. Denominação, tipo, espécie, origem e fornecedor dos genótipos de arroz avaliados quanto à dormência. Porto Alegre, RS. 2013.

Genótipos	Tipo	Espécie	Origem	Fornecedor
AV 15	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 172	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 223	daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	IRGA
AV 501	daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	EPAGRI
AV 503	daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	EPAGRI
AV 508	daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	EPAGRI
AV 511	daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	EPAGRI
Glaberrima	silvestre/cultivado	<i>O. glaberrima</i>	RS/Brasil	UFRGS
IRGA 417	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	RS/Brasil	IRGA
Kaybonnet	cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	EPAGRI

3.2.2 Análise fenotípica da dormência em populações de *Oryza* spp.

Os sacos foram enterrados a cinco centímetros de profundidade, em tanques de concreto com dimensões de 1,20 x 1,10 x 0,80 m, contendo solo hidromórfico classificado como gleissolo. Estes tanques estão localizados no Laboratório da Flora Ruderal (LAFLOR) da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre, RS. Os sacos foram enterrados em três conjuntos, ou seja, três barbantes com 2 m de

comprimento com suas respectivas repetições, o que possibilitou a análise da dormência em três etapas distintas. A disposição das sementes nos sacos e sua distribuição nos tanques visou proporcionar às sementes condições semelhantes às encontradas quando estão no banco de sementes do solo, em condições de campo. Desta forma, após a disposição dos sacos, os tanques foram mantidos em pousio, o aporte de água foi proporcionado apenas pela precipitação pluvial durante o inverno e com solo saturado durante o verão.

O experimento foi organizado em delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições, onde cada saco correspondeu a uma unidade experimental. As análises foram realizadas em outubro de 2010, outubro de 2011 e outubro de 2012, que correspondeu a 19, 31 e 43 meses após a deposição das sementes, respectivamente. Em cada ano um conjunto de sacos de sementes era desenterrado, sendo que o ano de 2010 foi classificado como primeiro, 2011 como segundo e 2012 como terceiro ano. No momento das avaliações, os sacos contendo as sementes foram retirados do solo (Figura 3A) e conduzidos ao Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS, onde foram devidamente lavados com água destilada para possibilitar a realização das análises de germinação e dormência (Figura 3B).

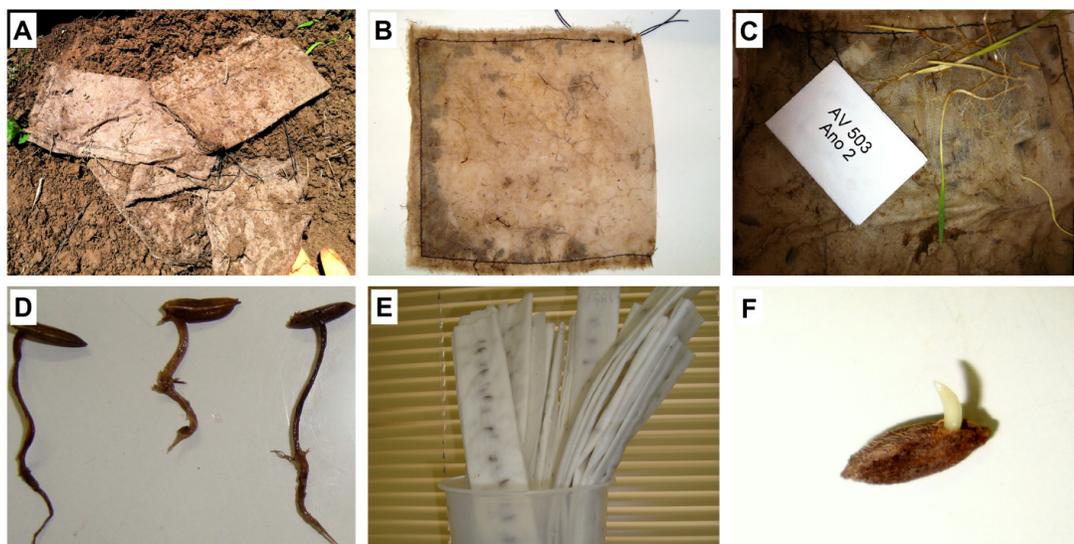


FIGURA 3. Ilustração da análise de germinação e dormência das sementes: Sacos contendo as sementes no momento em que foram retirados do solo (A); Sacos depois de lavados com água destilada (B); Sementes em processo de germinação a campo (C); Sementes germinadas a campo (D); Sementes colocadas em condições ideais para o processo de germinação (E); Semente de arroz em processo de germinação, radícula com 1 mm de comprimento (F). Porto Alegre, RS. 2013.

As análises foram iniciadas pela avaliação da germinação das sementes, que foi dividida em três partes. A primeira foi constituída da contagem das sementes que haviam germinado a campo, mas que já apresentam seus tecidos mortos (Figura 3D). A segunda foi realizada através da contagem de sementes que estavam em processo de germinação, que constou da visualização de plântulas desenvolvidas e de sementes com comprimento da radícula ≥ 1 mm (Figura 3 C e F). Na terceira etapa as sementes que ainda não haviam germinado foram submetidas a condições ideais para o processo de germinação, segundo método descrito por Zhang *et al.* (2004), conforme já descrito anteriormente. As sementes foram mantidas a temperatura de 25°C em câmaras de germinação. A avaliação da germinação foi realizada dez dias após a disposição das sementes no papel germinador e constitui da contagem do número de sementes germinadas. O critério adotado para a definição da germinação das sementes foi emergência da radícula ≥ 1 mm de comprimento (Figura 3F).

As sementes firmes remanescentes foram submetidas a método de superação de dormência através da exposição à temperatura de 50°C em estufa por seis dias. Após, estas foram colocadas novamente para germinar em rolos de papel germinador por um período de dez dias conforme descrito anteriormente. As sementes que não apresentaram o processo de absorção da água, mesmo após o método de quebra de dormência, foram submetidas ao teste de tetrazólio, para verificar a viabilidade do embrião (Brasil, 1992).

Os dados expressos em percentagem foram transformados em $y_{ij}^* = \sqrt{y_{ij} + 1}$ com o objetivo de atender as premissas de heterocedasticidade e normalidade da ANOVA. Após, os dados foram então submetidos à análise de variância (Apêndice 2 e 3) e quando significativo, aplicou-se o teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre médias através do software SAS 9.0 (SAS Institute, 2004). Os gráficos foram obtidos com o uso do programa Sigmaplot 12.

Com o objetivo de avaliar a influência da casca das sementes de arroz no caráter de dormência, realizou-se a análise de germinação das sementes com e sem casca, aos seis meses após a colheita destas sementes. Os genótipos de arroz analisados foram os mesmos descritos na Tabela 4. Após a colheita retirou-se a casca de 30 sementes de cada genótipo, cada grupo de 30 sementes constituiu uma repetição e cada genótipo foi composto por três repetições. Ainda neste mesmo momento, 30 sementes de cada genótipo com suas respectivas repetições foram mantidas com casca. Posteriormente a este processo, as sementes foram armazenadas por seis meses em temperatura de 10° C. Ao final do período, as sementes foram dispostas em condições ideais para germinação, conforme método descrito por Zhang *et al.* (2004), já descrito anteriormente. Os rolos de papel com as sementes foram mantidos por 10 dias em câmara de germinação, com temperatura de 25°C. Após este período realizou-se a contagem

de sementes germinadas, a fim de verificar a taxa de germinação de cada genótipo e a possível influência da presença e ausência da casca para a germinação das sementes. Após, os dados foram expressos em porcentagem e submetidos à análise de variância (Apêndice 2 e 3), quando significativo, aplicou-se o teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre médias através do software SAS 9.0 (SAS Institute, 2004). Os gráficos foram obtidos com o uso do programa Sigmaplot 12.

3.2.3 Expressão de genes relacionados à dormência através de RT-PCR em tempo real

No trabalho anterior foi possível realizar a identificação dos genótipos com níveis contrastantes de dormência. Através destes resultados obtidos já no segundo ano de análise, em 2011, foram escolhidos sete genótipos para realizar a análise de expressão de genes relacionados ao caráter de dormência (Tabela 5). Para este estudo foram escolhidos três genes que são descritos na literatura como relacionados com os mecanismos de dormência das sementes de arroz, *OsCYP707A5* (Liu *et al.*, 2011), *OsMADS29* (Li *et al.*, 2011a) e *SDR4* (Sugimoto *et al.*, 2010). A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica RT-PCR em tempo real.

TABELA 5. Genótipos utilizados na análise de expressão de genes relacionados ao caráter de dormência das sementes e nível de dormência conforme análise fenotípica do ano de 2011.

Genótipos	Tipo	Espécie	Origem	Nível dormência
AV 223	Daninho	<i>O. sativa</i>	RS/Brasil	Alto
AV 503	Daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	Médio
AV 508	Daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	Baixo
AV 511	Daninho	<i>O. sativa</i>	SC/Brasil	Alto
Glaberrima	silvestre/cultivado	<i>O. glaberrima</i>	RS/Brasil	Baixo
IRGA 417	Cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	RS/Brasil	Baixo
Kaybonnet	Cultivado	<i>O. sativa</i> sub. <i>indica</i>	SC/Brasil	Baixo

3.2.3.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O cultivo das plantas foi realizado na safra de 2011/12. Primeiramente, as sementes foram depositadas em papel germinador e incubadas em câmara de germinação a 25°C conforme descrito no item 3.2.2. Após, as sementes foram semeadas nos tanques de concreto quando estavam no estágio de emissão da radícula ≥ 1 mm e manejadas conforme descrito no item 3.1.1.

A relação da expressão dos genes *OsCYP707A5*, *OsMADS29* e *SDR4* com o mecanismo de dormência foi realizada em três etapas distintas: i) durante a formação da semente (formação do embrião); ii) semente madura (embrião maduro); iii) semente em processo de germinação (às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação em água). Nas três etapas da avaliação a coleta foi realizada com o auxílio de lâminas descartáveis de metal e com materiais esterilizados de forma a evitar a contaminação entre os materiais. Apresenta-se abaixo a descrição da metodologia para coleta de material para cada estágio de desenvolvimento da semente:

i) Semente em formação (formação do embrião): Inicialmente foi marcado diariamente com fita as panículas cuja parte mediana estava em antese. Aos 14 dias após foi realizada a coleta do material, que era imediatamente colocado em nitrogênio líquido (LN₂). A coleta do embrião em formação constituiu da estrutura

de 3 mm a partir do pedicelo, conforme descrição de Sugimoto *et al.*, (2010) (Figura 4A). Cada amostra foi composta por 30 embriões coletados da panícula de uma mesma planta, equivalente a aproximadamente 30 mg de material, que correspondeu a uma repetição. Cada genótipo contou com três repetições. Após a realização destas coletas as plantas foram mantidas até o momento da maturação e colheita das sementes para proporcionar a obtenção de material para as demais etapas descritas abaixo.

ii) Semente madura (embrião maduro): O estágio de embrião maduro foi considerado quando as sementes das plantas que apresentaram mais de dois terços de suas panículas totalmente dobradas e com sementes com resistência à pressão da unha. Neste momento as sementes foram coletadas e levadas ao laboratório, onde foram armazenadas e mantidas com casca por seis meses, em ambiente resfriado com temperatura de 8°C. Após este período, foi realizada a coleta de 30 embriões (aproximadamente 30 mg de material) (Figura 4B), originados de uma mesma planta, que constituiu uma repetição, conforme Liu *et al.*, (2011) (Figura 4B). Cada genótipo contou com três repetições. O material coletado foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido (LN₂).

iii) Sementes em processo de germinação: As sementes maduras foram submetidas a processo de superação de dormência com exposição à temperatura de 50°C em estufa por seis dias e após foram colocadas para germinar em papel germinador conforme método descrito por Zhang *et al.* (2004). Os rolos foram mantidos a temperatura de 25°C. Às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação, das sementes com casca, foram realizadas as coletas. Neste momento, a casca era retirada e 30 embriões originados de uma mesma planta (aproximadamente 30 mg de material) (Figura 4C), o que constituiu uma

repetição, sendo que cada genótipo contou com três repetições. O material foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido (LN₂).

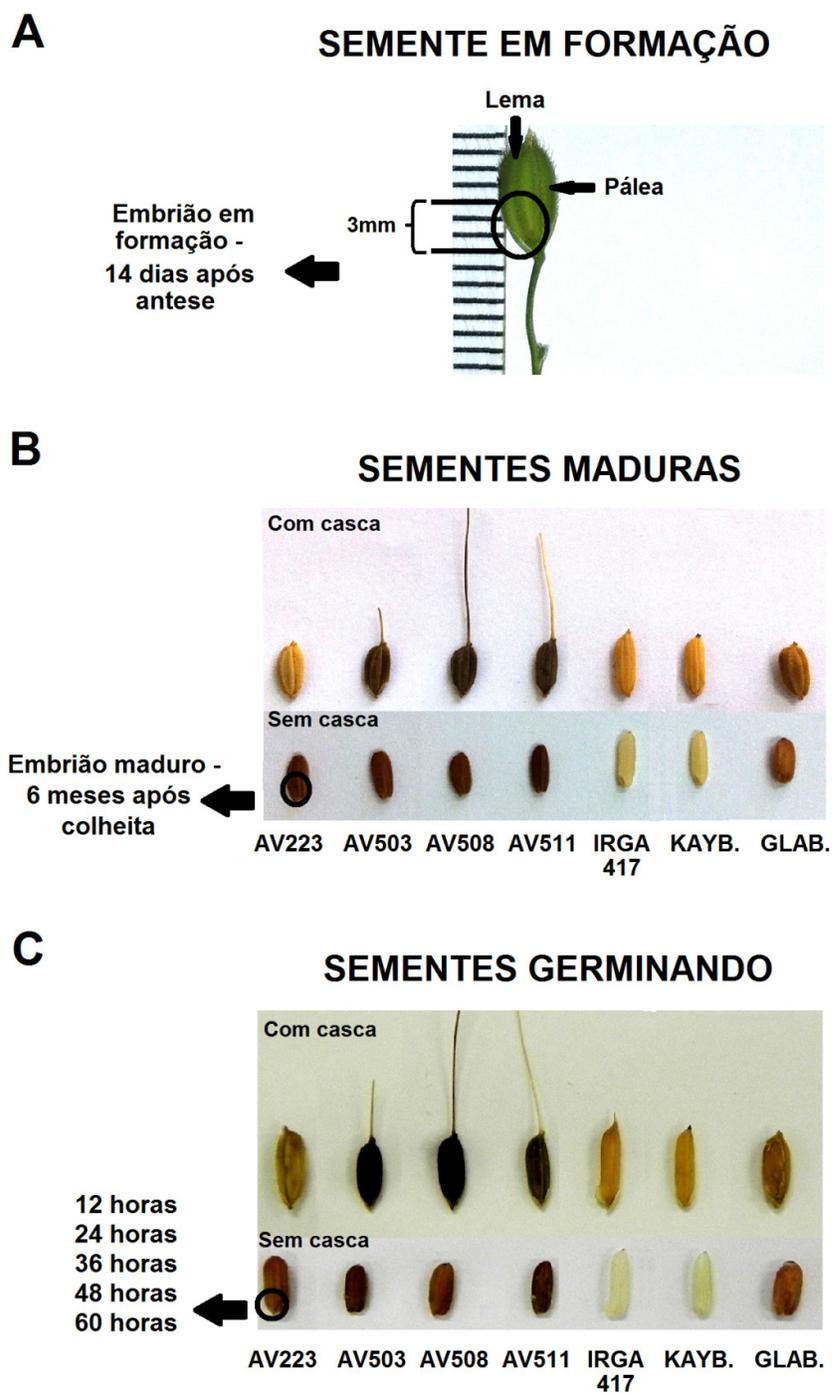


FIGURA 4. Momentos da coleta de material para extração de RNA: Semente em formação – embrião em formação, aos 14 dias após antese (A); Sementes maduras – embrião maduro, aos seis meses após colheita (B); Sementes germinando – às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação (C). Porto Alegre, RS. 2013.

A extração do RNA foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.1.2.1. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (Genesys 2™, Thermo Spectronic), em comprimento de onda de 260 nm e diluído em água livre de RNase a 1 µg µL⁻¹. Cada tratamento foi purificado com DNase® I (Invitrogen) em uma quantidade de 1 µg de RNA total, conforme recomendações do fabricante. A próxima etapa constou da obtenção da fita de cDNA (fita complementar de DNA) a partir do RNA através da transcriptase reversa SuperScript® III (Invitrogen) em quantidade de 1 µg de RNA utilizando iniciadores polidT.

3.2.3.2 *Primers utilizados*

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes *Sdr4* e *OsCYP707A5* foram sintetizados conforme sequência descrita por Sugimoto *et al.* (2010) e Liu *et al.* (2011), respectivamente. Os *primers* utilizados para o gene *OsMADS29* foram obtidos com auxílio do programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). No trabalho de Li *et al.* (2011a) é possível encontrar a sequência de um par de *primers* utilizado para amplificar o gene *OsMADS29*. No entanto, estes *primers* foram desenhados para análises em PCR convencional (semiquantitativa), que apresentam *amplicons* maiores que 300 pb, inviabilizando sua utilização para a técnica RT-PCR em tempo real. Desta forma, para o gene *OsMADS29* foram desenhados *primers* específicos para esta técnica, *OsMADS29-II* e *OsMADS29-III*, com auxílio do programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007).

Os critérios de seleção da sequência nucleotídica dos *primers* basearam-se na temperatura de pareamento de 60 °C, sequência de 20 pb e com 50 a 60% das bases nitrogenadas guanina e citosina e tamanho dos *amplicons* entre 90 e 200 pb (Dussault & Pouliot, 2006). As sequências nucleotídicas dos genes foram obtidas do *genbank* e selecionaram-se regiões dos exons para pareamento dos

primers. Na Tabela 6 encontram-se as sequências de todos os *primers* utilizados, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado.

TABELA 6. Sequências dos *primers* utilizados para o estudo da expressão gênica de genes relacionados à dormência das sementes, através da técnica de RT-PCR em tempo real, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento esperado. Porto Alegre, RS. 2013.

Gene	Primer	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tm ¹	Pares de bases ²
<i>OsCYP707A5</i> (Liu <i>et al.</i> ,2011)	<i>OsCYP707A5_F</i>	AGATTGCCAAGGAGAAAGA	55	126
	<i>OsCYP707A5_R</i>	TGAAGGTGAAGGAGAGGATG	58	
<i>OsMADS29-II</i>	<i>OsMADS29-II_F</i>	CCAGCTTCTCCATCTCGTTC	60	121
	<i>OsMADS29-II_R</i>	CTGCCAGCAGTTGAAATGAA	60	
<i>OsMADS29-III</i>	<i>OsMADS29-III_F</i>	TCCTCATCCGAGTCATCTCC	60	103
	<i>OsMADS29-III_R</i>	CTGCCAGCAGTTGAAATGAA	60	
<i>SDR4</i> (Sugimoto <i>et al.</i> ,2010)	<i>SDR4_F</i>	GTGGACTTCATTTCAACTCG	56	218
	<i>SDR4_R</i>	GATGTATAAGATAGTCCC	40	

¹ Temperatura em °C de pareamento do *primer*.

² Tamanho do fragmento esperado (pb).

Com relação ao gene *OsMADS29*, foram desenhados dois pares de *primers* para este gene, conforme mostra na Tabela 6, no entanto, apenas o par de *primers OsMADS29-III* foi utilizado para as reações de RT-PCR em tempo real, pois apresentou melhores resultados na curva de amplificação e dissociação, quando comparado ao par de *primers OsMADS29-II*.

3.2.3.3 Reação de RT-PCR em tempo real

A amplificação pela RT-PCR em tempo real foi realizada em equipamento 7300 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems) em placas PCR-96M2 – HS – C® (Axygen) contendo 96 poços com selador MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems), conforme metodologia descrita no item 3.1.3.3.

As ampliações resultantes da RT-PCR em tempo real foram analisadas pela quantificação relativa, e o controle endógeno utilizado foi o gene 28S rRNA, conforme metodologia descrita no item 3.1.3.4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O manejo de plantas daninhas é fundamental para o alcance do potencial de rendimento de culturas agrícolas. Na cultura do arroz este problema é acentuado pela existência do arroz vermelho, planta da mesma espécie do arroz cultivado. Nesse trabalho buscou-se analisar as características de degrane e de dormência das sementes de arroz vermelho. A partir dos resultados obtidos espera-se compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos nestes caracteres, o que pode contribuir para o desenvolvimento de técnicas que reduzam os problemas causados pela principal planta daninha do sistema de cultivo do arroz irrigado no Brasil.

4.1 Degrane

4.1.1 Análise fenotípica de genótipos de arroz quanto ao nível de degrane

A análise da resistência à tensão de ruptura (RTR) nos grãos da parte mediana da panícula mostrou que houve variação significativa entre os genótipos avaliados (Apêndice 1). A menor força necessária para desprender o grão da panícula foi apresentada por ecótipos de arroz vermelho, que apresentaram pouca variação quanto ao nível de degrane (Figura 5). Enfatiza-se que quanto menor a RTR, maior é o nível de degrane do genótipo. Dentre os ecótipos de arroz vermelho, AV 503 apresentou o menor nível de degrane, necessitando de

aproximadamente 50 gf para desprender o grão da panícula. Isto representa cerca de 30 gf a menos que a média geral de todos os genótipos avaliados, que foi de 79,3 gf (Figura 5). As cultivares Lacassine, IRGA 417 e Epagri 109 apresentaram degrane moderado, com RTR próxima a 80 gf. A espécie silvestre *O. glaberrima*, as cultivares EEI 23, Batatais, EEI 31, Cica 8, EMPASC 100 e Nipponbare apresentaram baixo nível de degrane, a RTR destes genótipos foi superior a 111 gf.

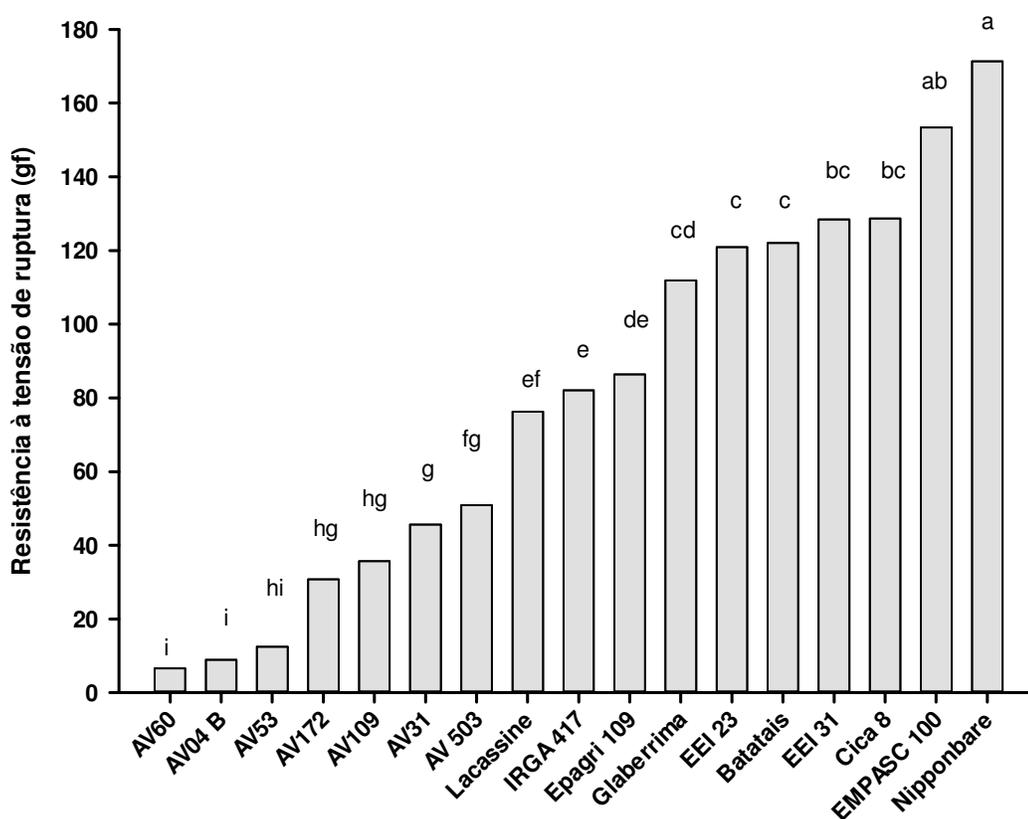


FIGURA 5. Resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo, no momento da maturação fisiológica das sementes, nos genótipos de arroz avaliados – Safra de 2011/12. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Porto Alegre, RS. 2013.

Pouca variação em relação ao degrane também havia sido observada em ecótipos de arroz vermelho, onde dos 16 ecótipos avaliados, 11 apresentaram fácil degrane, quatro foram de degrane intermediário e apenas um ecótipo

apresentou difícil degrane (Schwanke *et al.*, 2008). As cultivares BR-IRGA 409 e 410 e El Paso L 144 foram classificados com nível de degrane intermediário, e IRGA 417 de difícil degrane (Schwanke *et al.*, 2008). O trabalho que avaliou o degrane em 241 acessos de arroz vermelho e 125 cultivares de arroz provindos da Ásia, Sul da Europa e América do Norte, verificou que todas as cultivares apresentaram baixo degrane, enquanto que todos os acessos de arroz vermelho, provindos de mais de 12 países diferentes, apresentaram alto nível de degrane (Zhu *et al.*, 2012).

Os ecótipos de arroz vermelho, as cultivares de arroz e a espécie silvestre *O. glaberrima* presentes na Figura 5 também foram avaliados com relação ao degrane por Nunes (2012) nas safras de 2008/09 e 2010/11. O estudo verificou que não houve variação pronunciada do degrane de uma safra para outra, pois dos 36 genótipos analisados, somente dois mudaram consideravelmente o nível do degrane de uma avaliação para outra (Nunes, 2012). Comparativamente, os resultados obtidos no presente estudo são bastante semelhantes daqueles obtidos por Nunes (2012), principalmente com relação à safra de 2010/11, pois os genótipos analisados classificaram-se no mesmo grupo de nível de degrane. Como ambos os trabalhos utilizaram a mesma metodologia, confirma-se que esta é precisa e possui reprodutibilidade, podendo ser utilizada com segurança para a seleção de materiais com degrane contrastantes. Este fato é bastante positivo, pois vários trabalhos sobre degrane ainda utilizam o método qualitativo, como o utilizado por Zhu *et al.* (2012), que avalia o degrane através da movimentação realizada nas panículas maduras e observação do comportamento dos grãos.

Através dos dados apresentados acima evidencia-se que grande parte dos ecótipos de arroz vermelho utiliza o degrane como forma de dispersão das sementes e perpetuação da espécie. Além disso, os resultados indicam que os

ecótipos de arroz vermelho apresentam pouca variabilidade fenotípica com relação ao degrane. No entanto, a variabilidade aumenta quando consideramos as cultivares de arroz. Isto ocorre devido ao processo de domesticação do arroz que está diretamente relacionado à redução do degrane natural das sementes desta cultura (Zhang *et al.*, 2009).

A magnitude da RTR obtida variou entre 7 e 180 gf (Figura 5). Estes valores foram próximos daqueles encontrados por Akasaka *et al.* (2011), onde a RTR verificada em cultivares e ecótipos de arroz vermelho variou entre 0 e 220 gf. Em outros trabalhos a magnitude dos dados da RTR obtida ficou entre 20 e 260 gf (Nunes, 2012), e ainda 20 e 180 gf (Zhu *et al.*, 2012). Isto indica que os valores obtidos da RTR no presente estudo são comparáveis às avaliações relacionadas ao degrane em sementes de arroz, que vem sendo utilizadas para o estudo dos fenômenos fisiológicos e processos moleculares responsáveis pela ocorrência desta característica.

4.1.2 Expressão de genes relacionados à parede celular na junção entre o pedicelo e a flor

A expressão de genes relacionados à parede celular, como é o caso dos genes *OsCel9D* e *OsXTH8*, pode estar relacionada com a característica de degrane em *O. sativa* (Nunes, 2012). Através do estudo da expressão de genes candidatos é possível relacionar a expressão gênica com o nível de degrane apresentado por ecótipos contrastantes (Thurber *et al.*, 2010). Teoricamente, a variação da expressão do gene em fenótipos com alto e baixo degrane pode indicar a relação deste gene com o caráter em questão. Por exemplo, os genes com menor expressão nos ecótipos que apresentam alto degrane, em

comparação a uma maior expressão nos ecótipos que não apresentam degrane teoricamente estão relacionados à repressão desta característica.

Os genes *OsCel9D* (sinônimo *OsGLU1*) e *OsXTH8* (sinônimo *OsXRT5*) relacionados à parede celular foram selecionados para avaliação quanto à expressão relativa, pois já haviam mostrado relação com o caráter degrane (Nunes, 2012). Entretanto, eles haviam sido testados em poucos genótipos, dois genótipos de alto degrane (AV 31 e AV 60) e dois genótipos de baixo degrane (Batatais e Lacassine) (Nunes, 2012). Assim, no presente estudo a expressão dos genes *OsCel9D* e *OsXTH8* foi avaliada em 17 genótipos com diferentes níveis de degrane, com o intuito de validar a associação com o caráter em questão.

O gene *OsCel9D* apresentou expressão na região entre o pedicelo e a flor, a qual pode estar relacionada com a repressão do processo de abscisão (Figura 6). Os ecótipos de arroz vermelho apresentaram menor expressão relativa do gene *OsCel9D*, quando comparado as cultivares analisadas (Figura 6). Outra evidência que o gene *OsCel9D* poderia estar relacionado com a repressão do processo de abscisão está no fato que os ecótipos de arroz vermelho AV 04B, AV 53, AV 172, AV 109, AV 31 e AV 503 apresentaram maior nível de expressão relativa quando comparado ao AV 60 (Figura 6), que apresentou maior degrane (Figura 5). Nas cultivares de arroz a expressão relativa foi seis a 23 vezes superior ao ecótipo AV 60 (Figura 6).

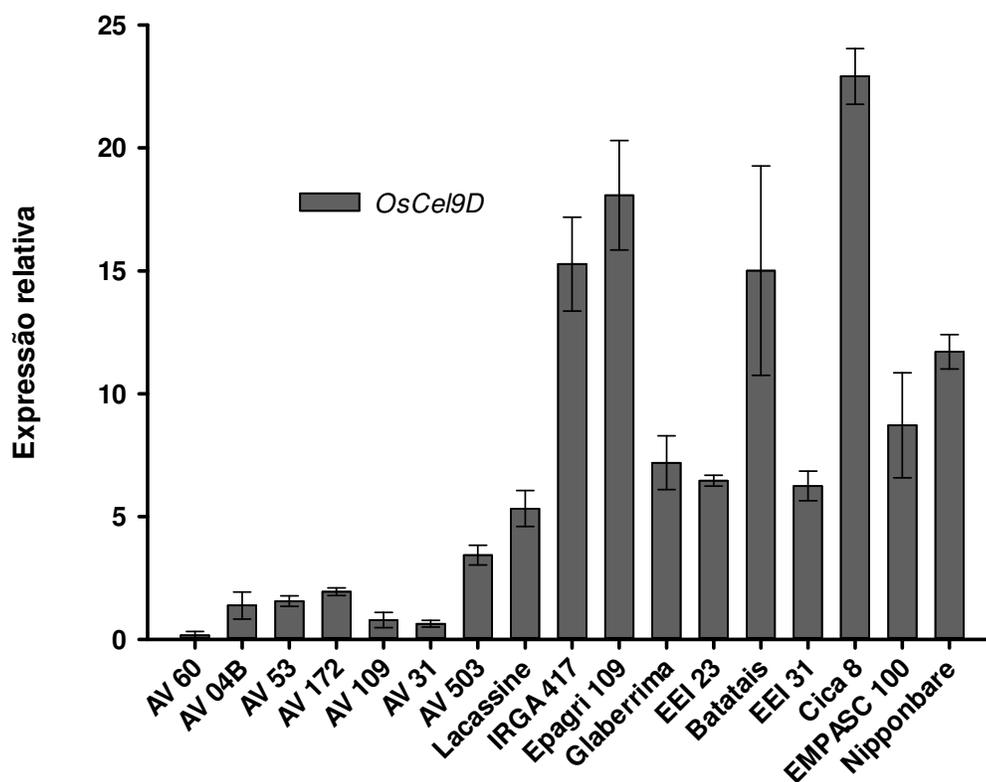


FIGURA 6. Expressão relativa do gene *OsCel9D* em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*, aos dez dias após a polinização. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

Ao compararmos os resultados apresentados em cada genótipo na fenotipagem (Figura 5) com a expressão relativa do gene *OsCel9D* (Figura 6), verifica-se que há uma relação inversa entre o fenótipo de degrane e a expressão relativa observada (Figura 7). Conforme a Figura 7, os menores níveis de expressão do gene *OsCel9D* ocasionaram menores valores de RTR em gf para desprender o grão da panícula, o que resulta em maior degrane. No entanto, esta relação não é totalmente proporcional, provavelmente devido à expressão de outros genes que pode estar afetando o degrane nos fenótipos analisados, já que esta característica é um caráter complexo e poligênico (Koniski *et al.*, 2006).

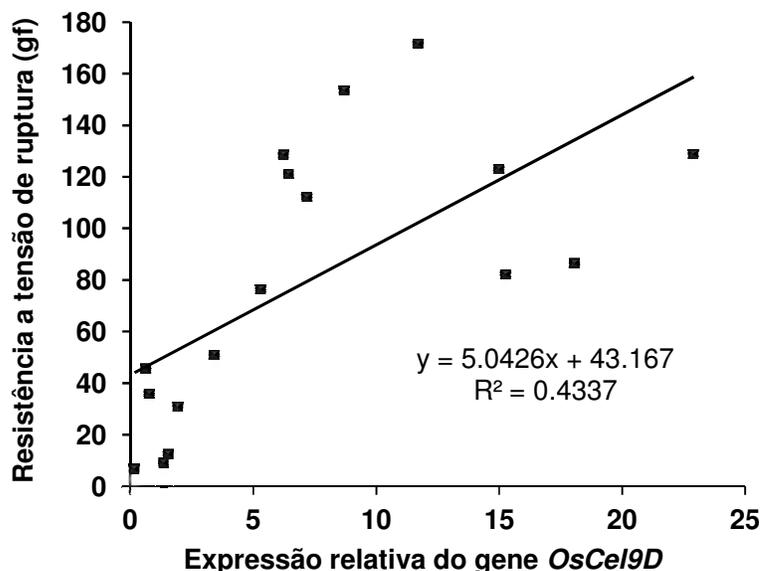


FIGURA 7. Relação da resistência à tensão de ruptura com a expressão relativa do gene *OsCel9D*. Regressão significativa através do teste de Fischer ($p \leq 0,05$). Porto Alegre, RS. 2013.

O estudo realizado com os genótipos AV 31, AV 60, Lacassine e Batatais obteve resultado semelhante (Nunes, 2012). A expressão relativa do gene *OsCel9D* verificada no ecótipo de arroz vermelho AV 31 foi semelhante ao AV 60, enquanto que nas cultivares de arroz Lacassine e Batatais, a expressão relativa foi de cinco e 30 vezes superior ao AV 60, respectivamente (Nunes, 2012).

O gene *OsCel9D* codifica uma proteína do tipo endo-1,4-beta-glucanase (Yoshida *et al.*, 2006). No genoma do arroz, estas proteínas formam uma família gênica com 15 membros, em que cada membro possui padrão de expressão distinto em diferentes órgãos (Zhou *et al.*, 2006). Esta família possui papel importante nos processos de crescimento e desenvolvimento em plantas de arroz (Zhou *et al.*, 2006). Mutações no gene *OsCel9D* reduzem o alongamento celular e o conteúdo de celulose, mas aumentam o conteúdo de pectina (Zhou *et al.*, 2006), sugerindo que *OsCel9D* esteja relacionado com os componentes da parede celular das plantas de arroz. Dessa forma, a mudança dos componentes da

parede celular, causada pelo maior nível de expressão do gene poderia dificultar o processo de abscisão em comparação a ecótipos que apresentam degrane.

Com relação ao gene *OsXTH8* também verificou-se expressão na região entre o pedicelo e a flor, em todos os genótipos avaliados (Figura 8). Ainda, o padrão de expressão deste gene mostrou relação com o caráter de degrane das sementes. Dos sete ecótipos de arroz vermelho analisados, seis apresentaram expressão relativa superior a todas às cultivares de arroz observadas, onde o degrane é reduzido (Figura 8). O ecótipo AV 60 apresentou expressão relativa superior apenas às cultivares Cica 8, EMPASC 100 e Nipponbare (Figura 8).

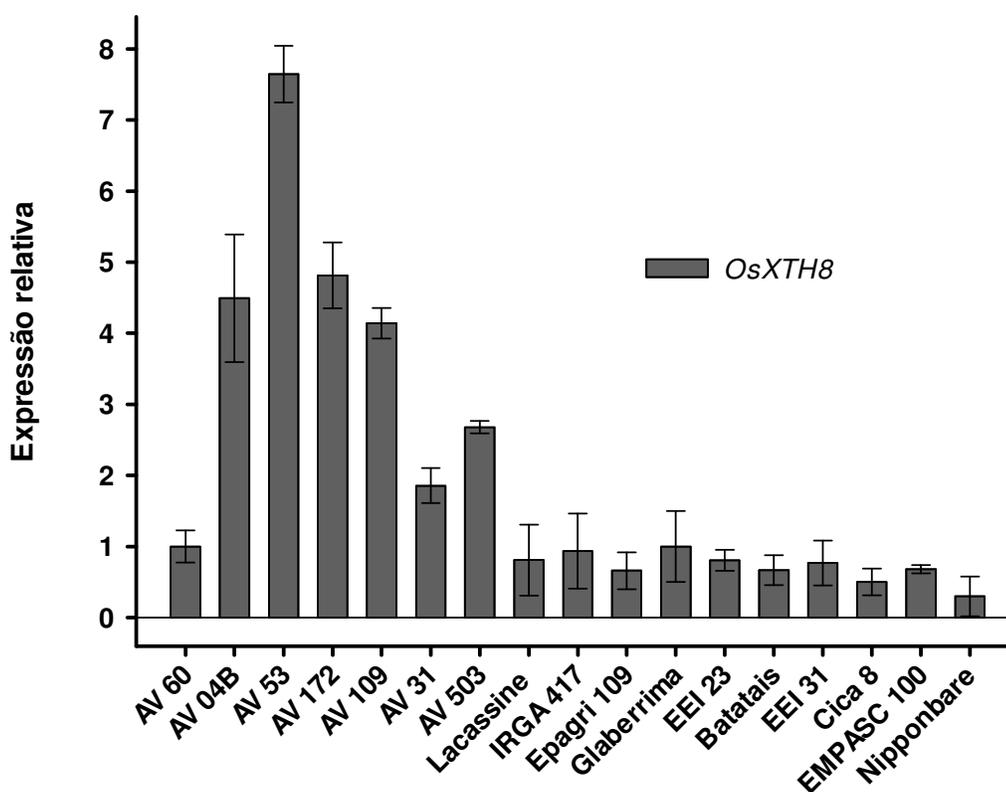


FIGURA 8. Expressão relativa do gene *OsXTH8* em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*, aos dez dias após a polinização. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

O presente estudo verificou nos genótipos avaliados, com exceção apenas do ecótipo AV 60, que o padrão de expressão do gene *OsXTH8* mostrou relação direta com a presença do degrane, e desta forma, relação inversa com a RTR em gf apresentadas pelos grãos (Figura 9). Resultados obtidos por Nunes (2012) também mostraram envolvimento do gene *OsXTH8* com o caráter de degrane. As cultivares de arroz Batatais e Lacassine que apresentam baixo nível de degrane, apresentaram expressão relativa inferior ao controle AV 60, que possui alto degrane. Os ecótipo de arroz vermelho analisados, AV 31 e AV 60, apresentaram expressão relativa semelhante (Nunes, 2012).

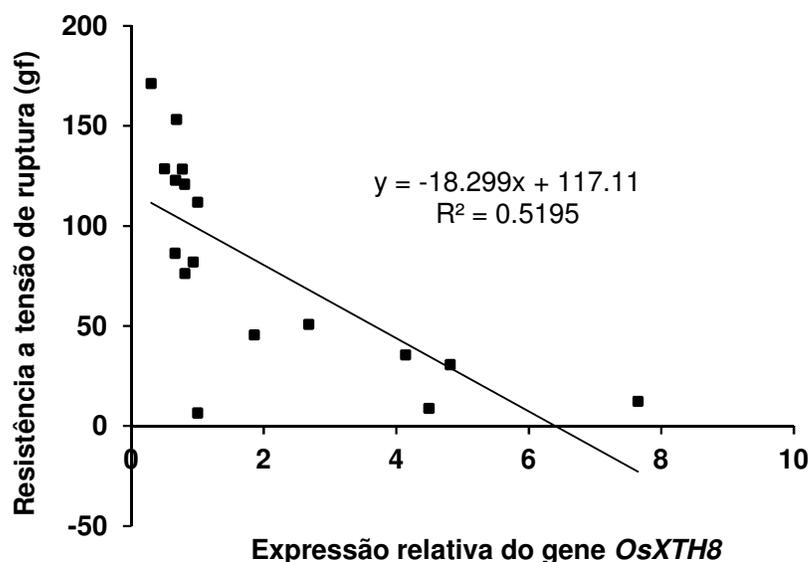


FIGURA 9. Relação da resistência à tensão de ruptura com a expressão relativa do gene *OsXTH8*. Regressão significativa através do teste de Fischer a $p \leq 0,05$. Porto Alegre, RS. 2013.

O gene *OsXTH8* codifica a enzima *xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase* (Jan *et al.*, 2004). Quando avaliada a variação nucleotídica do gene *OsXTH8* verificou-se mutações apenas no intron um do gene, as quais não estão relacionadas aos níveis de degrane, nem à expressão do gene (Nunes, 2012).

Destas, uma mutação foi verificada na posição 540, quando entre os 36 genótipos avaliados, 30 apresentaram o nucleotídeo citosina e somente seis genótipos apresentaram o nucleotídeo timina (Nunes, 2012). Na posição 530 também foi verificada outra mutação, onze genótipos apresentaram o nucleotídeo guanina e os demais genótipos apresentaram o nucleotídeo adenina nesta posição (Nunes, 2012). No entanto, estas mutações estão presentes tanto em genótipos com alto degrane, quanto naqueles com baixo degrane (Nunes, 2012).

A enzima codificada pelo gene *OsXTH8* catalisa a clivagem de polímeros de xiloglucana e a sua transferência para outros polímeros de xiloglucana (Jan *et al.*, 2004). Ainda, estas enzimas afrouxam a parede celular para a expansão celular regulada pelo turgor (Rose *et al.*, 2002). O gene *OsXTH8* é expresso em elevados níveis em células que estão ativamente em processo de alongamento e diferenciação e, plantas contendo constructos com o gene silenciado apresentam crescimento limitado (Jan *et al.*, 2004). Assim, durante o processo de abscisão, a expressão deste gene poderia facilitar a queda natural do grão através da clivagem de polímeros da parede celular permitindo que as células da camada de abscisão separassem com o menor esforço possível.

4.1.3 Expressão e variação nucleotídica do gene *Sh4*

O gene *Sh4* é um dos três genes já relatados com efeito comprovado sobre o degrane (Li *et al.*, 2006b). Acredita-se que este gene seja um fator de transcrição, que possui importante função na formação da camada de abscisão e/ou que este gene esteja envolvido na ativação do processo de abscisão (Li *et al.*, 2006b). No entanto, estudos recentes não encontraram relação da expressão deste gene com o caráter degrane (Akasaka *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012).

No presente estudo verificou-se que o gene *Sh4* teve expressão na região entre o pedicelo e a flor, aos dez dias após a polinização. Entretanto sua expressão relativa não mostrou relação direta com nível de degrane, pois fenótipos contrastantes apresentaram nível de expressão bastante semelhante (Figura 10). Por exemplo, o ecótipo AV 04B que possui alto nível de degrane, e a cultivar Nipponbare que possui baixo degrane, mostraram pouca variação com relação à expressão relativa do gene *Sh4*, pois apresentaram respectivamente valores cinco e seis vezes superiores ao ecótipo AV 60. Ainda, contrariamente ao esperado, os maiores níveis de expressão foram verificados na cultivar Batatais e na espécie silvestre *O. glaberrima* que apresentaram respectivamente oito e sete vezes maior expressão que o ecótipo AV 60. Isto indica que a expressão do gene *Sh4* na região entre o pedicelo e a flor, aos dez dias após a polinização, não está relacionada com a formação da camada de abscisão nos genótipos testados.

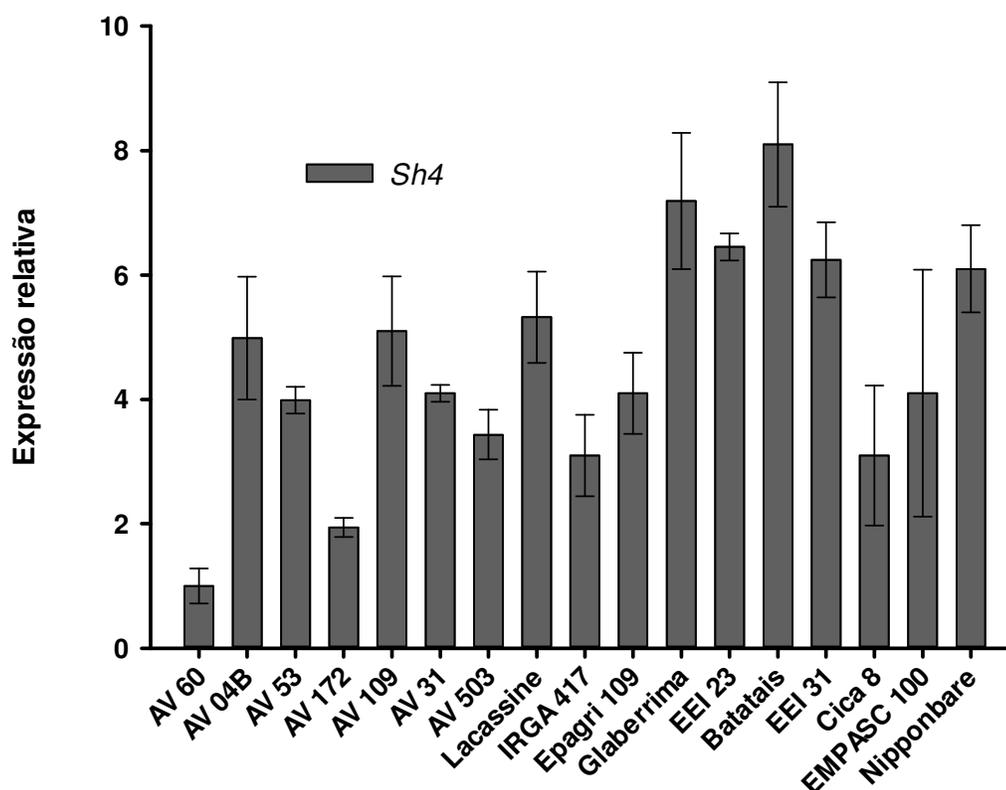


FIGURA 10. Expressão relativa do gene *Sh4* em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*, aos dez dias após a polinização. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

Em genótipos providos da cidade de Okayama, no Japão, também não foi verificado relação da expressão do gene *Sh4* com o caráter de degrane (Akasaka *et al.*, 2011). Ainda foram encontradas novas mutações no exon um do gene *Sh4*, o que não parece estar relacionado com a ocorrência do degrane, já que apenas dois dos cinco genótipos de arroz vermelho apresentaram as mutações (Akasaka *et al.*, 2011).

Outro estudo que avaliou acessos de arroz silvestre, arroz daninho e cultivares de arroz, oriundos de regiões da Ásia, sul da Europa e América do Norte verificou que 73,5% dos acessos de arroz silvestre continham o nucleotídeo G na região do exon um (Zhu *et al.*, 2012). Enquanto que uma minoria significativa, 26,5% dos acessos silvestres, apresentava a mutação G₂₃₇T no gene

Sh4 (Zhu *et al.*, 2012). Ainda, 100% dos acessos de arroz daninho analisados continham o nucleotídeo T, diferentemente do esperado, pois todos os acessos de arroz daninho apresentaram degrane (Zhu *et al.*, 2012). Assim, não foi encontrada relação entre a presença do SNP (G – T) com o caráter de degrane, tanto nos acessos de arroz silvestre e daninho, como nas cultivares de arroz (Zhu *et al.*, 2012).

Conforme já comentado, os estudos realizados no Rio Grande do Sul com duas cultivares de arroz (Batatais e Lacassine) e dois ecótipos de arroz vermelho (AV 31 e AV 60), também não mostraram relação direta da expressão do gene *Sh4* com a ocorrência do degrane (Nunes, 2012). No mesmo trabalho, verificaram-se níveis de expressão do gene *Sh4* semelhantes entre a cultivar Batatais e os ecótipos de arroz vermelho AV 31 e AV 60. Como a cultivar Batatais apresentou menor degrane em relação aos ecótipos de arroz vermelho, era esperado uma menor expressão, como a apresentada pela cultivar Lacassine, o que de fato não ocorreu (Nunes, 2012). No entanto, neste último trabalho, os genótipos analisados não foram sequenciados, o que impossibilitou a verificação da existência da mutação no éxon um do gene *Sh4* (substituição do nucleotídeo G por T). Os resultados evidenciam informações distintas daquelas apontadas inicialmente por Li *et al.* (2006b), que mostram que o gene *Sh4* possui uma importante função na formação da camada de abscisão e/ou que este gene pode estar envolvido na ativação do processo de abscisão.

O presente estudo analisou também a possível existência da mutação G₂₃₇T no gene *Sh4*. Esta análise foi obtida através do sequenciamento da região de interesse do gene *Sh4*, em duas cultivares de arroz, Batatais e Nipponbare, no ecótipo de arroz vermelho AV 503 e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Os resultados do sequenciamento do gene *Sh4* mostraram ausência da mutação

G₂₃₇T no gene *Sh4* (Figura 11). Todos os genótipos analisados apresentaram o nucleotídeo guanina na posição 237 do exon um do gene *Sh4*. Isto intensifica a existência de resultados distintos daqueles encontrados por Li *et al.* (2006) e Thurber *et al.* (2010) que observaram substituição do nucleotídeo G por T, ocasionando a substituição do aminoácido asparagina por lisina (Li *et al.*, 2006b). Estes autores relacionam esta alteração como responsável pelo desenvolvimento incompleto da camada de abscisão e origem da ausência de debulha no arroz cultivado (Li *et al.*, 2006b; Thurber *et al.*, 2010). A hipótese apresentada por Zhu *et al.* (2012) aborda que a diminuição do caráter de deigrane devido à presença do nucleotídeo T pode ocorrer apenas em alguns genótipos que possuem algumas características favoráveis a este evento ou ainda, que haja a presença de outros *loci* que foram previamente selecionados durante o processo de domesticação.

```

Modelo          CCCC AACGCCGGCGCGCGGTCGTCGTCGTCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGCGTCT 240
AV503          CCCC AACGCCGGCGCGCGGTCGTCGTCGTCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGCGTCT 124
Nipponbare     CCCC AACGCCGGCGCGCGGTCGTCGTCGTCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGCGTCT 122
O.glaberrima   CCCC AACGCCGGCGCGCGGTCGTCGTCGTCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGCGTCT 113
Batatais       CCCC AACGCCGGCGCGCGGTCGTCGTCGTCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGCGTCT 84
*****

Modelo          CGTGCAGCGTCCAGTTCCCCTTGCGGTAGTCCC GCGGCGCCGACCCCGACGCCGGCGACG 300
AV503          CGTGCAGCGTCCAGTTCCCCTTGCGGTAGTCCC GCGGCGCCGACCCCGACGCCGGCGACG 184
Nipponbare     CGTGCAGCGTCCAGTTCCCCTTGCGGTAGTCCC GCGGCGCCGACCCCGACGCCGGCGACG 182
O.glaberrima   CGTGCAGCGTCCAGTTCCCCTTGCGGTAGTCCC GCGGCGCCGACCCCGACGCCGGCGACG 173
Batatais       CGTGCAGCGTCCAGTTCCCCTTGCGGTAGTCCC GCGGCGCCGACCCCGACGCCGGCGACG 144
*****

Modelo          GCGGCGGCGGCGCGCCCGCCCGTCGCCCCGACGGCGGCGTAGCAGTCAGGTGCCCGTGGC 360
AV503          GCGGCGGCGGCGCGCCCGCCCGTCGCCCCGACGGCGGCGTAGCAGTCAGGTGCCCGTGGC 244
Nipponbare     GCGGCGGCGGCGCGCCCGCCCGTCGCCCCGACGGCGGCGTAGCAGTCAGGTGCCCGTGGC 242
O.glaberrima   GCGGCGGCGGCGCGCCCGCCCGTCGCCCCGACGGCGGCGTAGCAGTCAGGTGCCCGTGGC 233
Batatais       GCGGCGGCGGCGCGCCCGCCCGTCGCCCCGACGGCGGCGTAGCAGTCAGGTGCCCGTGGC 204
*****

Modelo          CGTGGCCGTGCGCGCGGAGCAGCGCGAGCGGCGAGACCGCCGCCCGCGGTTCGAGGCGG 420
AV503          CGTGGCCGTGCGCGCGGAGCAGCGCGAGCGGCGAGACCGCCGCCCGCGGTTCGAGGCGG 304
Nipponbare     CGTGGCCGTGCGCGCGGAGCAGCGCGAGCGGCGAGACCGCCGCCCGCGGTTCGAGGCGG 302
O.glaberrima   CGTGGCCGTGCGCGCGGAGCAGCGCGAGCGGCGAGACCGCCGCCCGCGGTTCGAGGCGG 293
Batatais       CGTGGCCGTGCGCGCGGAGCAGCGCGAGCGGCGAGACCGCCGCCCGCGGTTCGAGGCGG 264
*****

```

FIGURA 11. Alinhamento parcial das sequências do exon um do gene *Sh4*, em quatro genótipos de arroz, com base na sequência modelo AL606619 (*GenBank*). Fita senso. Porto Alegre, RS. 2013.

4.2 Dormência

4.2.1 Análise fenotípica de genótipos de arroz quanto ao nível de dormência

A análise fenotípica da dormência das sementes de genótipos de arroz baseou-se em avaliações indiretas. Esta avaliação foi realizada através da contagem de sementes germinadas, pois quando o processo de germinação ocorre indica ausência do caráter dormência. A dormência das sementes é uma característica onde sementes viáveis não apresentam germinação, mesmo sob condições ambientais favoráveis a este processo (Goggin *et al.*, 2010). Ainda, realizou-se o método de superação da dormência e de fato, só foram consideradas sementes dormentes aquelas que germinaram após adição do método de quebra de dormência. A análise fenotípica foi realizada através da observação do comportamento das sementes ao longo de três anos e sete meses após a deposição das sementes sob o solo, em condições similares as ocorrentes a campo. A cada ano foi desenterrado um lote de sementes com todos os genótipos em estudo e suas respectivas repetições, o que possibilitou avaliar o comportamento destas sementes ao longo do tempo.

A ANOVA dos resultados de germinação a campo, efetuada nos anos de 2010, 2011 e 2012, indicou a significância dos efeitos simples de genótipos e período de permanência das sementes no solo aos 19, 31 e 43 meses, e da interação entre os genótipos e o tempo em que as sementes ficaram presentes enterradas (Apêndice 2A). A cultivar Kaybonnet apresentou alta germinação já no primeiro ano, após 19 meses enterrada no solo, quando mais de 90% de suas sementes apresentavam-se germinadas ou em processo de germinação (Tabela 7). A cultivar IRGA 417 teve a segunda maior taxa de germinação dentre os genótipos avaliados, 62% (Tabela 7). No primeiro ano os ecótipos de arroz

vermelho apresentaram taxa de germinação entre 3 e 28%. A espécie silvestre teve comportamento semelhante aos ecótipos de arroz vermelho, pois apresentou taxa de germinação de 14% (Tabela 7).

TABELA 7. Taxa de germinação a campo de sementes de cultivares de arroz, ecótipos de arroz vermelho e espécie *O.glaberrima* germinadas aos 19, 31 e 43 meses após serem depositadas no solo.

Genótipos	Tempo após deposição das sementes no solo								
	Primeiro Ano (2010) 19 meses			Segundo Ano (2011) 31 meses			Terceiro Ano (2012) 43 meses		
	----- Sementes germinadas a campo (%) -----								
AV 15	B *	22,1	b	B	57,0	a	B	52,3	a
AV 172	B	27,4	b	B	59,9	a	B	56,1	a
AV 223	C	5,0	b	C	11,4	b	B	35,3	a
AV 501	C	3,8	c	C	21,2	b	B	41,9	a
AV 503	BC	11,5	b	AB	71,1	a	B	51,3	a
AV 508	BC	10,5	b	A	97,9	a	A	80,2	a
AV 511	C	3,9	b	C	28,6	a	B	34,8	a
Glaberrima	BC	14,0	b	AB	87,7	a	A	93,4	a
IRGA417	A	62,3	b	A	98,4	a	A	100	a
Kaybonnet	A	90,8	^{ns}	A	99,9		A	100	
CV ¹									6,4

^{*}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e antecedidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹ Coeficiente de variação.

No segundo ano, 31 meses após sua deposição no solo, as cultivares Kaybonnet e IRGA 417 apresentaram praticamente todas suas sementes germinadas, enquanto que os ecótipos de arroz vermelho AV 223, AV 501 e AV 511 apresentaram taxa de germinação a campo inferior a 30% (Tabela 7). Diferentemente do comportamento observado no primeiro ano, no segundo ano a espécie silvestre *O. glaberrima* apresentou comportamento semelhante as cultivares de arroz, pois verificou-se 88% de germinação. O ecótipo AV 508 foi o único ecótipo de arroz vermelho que mostrou alta germinação a campo, verificou-se 98% de germinação de suas sementes (Tabela 7). Esta diferença, em relação aos demais ecótipos de arroz vermelho, poderia ser explicada pela existência de populações de arroz vermelho com características divergentes quanto a

dormência (Noldin *et al.*, 1999). Dawson & Bruns (1975) ressaltam ainda que diferenças mínimas nas condições do solo podem afetar substancialmente a sobrevivência das sementes e comportamento destas no solo. Davis *et al.* (2005) apontam também que fatores ambientais e profundidade de dispersão da semente afetam a diferença entre ecótipos na persistência das sementes no solo. No entanto, é mais provável que esta diferença apresentada pelo ecótipo AV 508 esteja ligada a características genéticas, pois todos os ecótipos e suas respectivas repetições foram dispostos no mesmo tanque, com mesma profundidade e manejados da mesma forma.

Após 43 meses enterradas no solo fica evidente que as sementes das cultivares não estão mais dispostas no banco de sementes, pois já completaram 100% de germinação a campo (Tabela 7). Contrariamente, dos sete ecótipos de arroz vermelho analisados, seis ainda apresentam mais de 46% de suas sementes sem germinar (Tabela 7). Ou seja, após três anos e sete meses da deposição das sementes no solo, é possível verificar ecótipos que apresentaram apenas um terço de suas sementes germinadas, como é caso dos ecótipos de AV 511 e AV 223 que mostraram respectivamente 35 e 36% de germinação (Tabela 7). As sementes da espécie *O. glaberrima* continuaram apresentando comportamento semelhante as cultivares Kaybonnet e IRGA 417 (Tabela 7). Pelo fato das sementes de todos os genótipos terem sido expostas às mesmas condições ambientais, a taxa inferior de germinação das sementes de arroz vermelho, indica de forma indireta que estas sementes possivelmente possuem alta taxa de dormência.

Posteriormente a etapa de contagem das sementes germinadas a campo, as sementes remanescentes foram colocadas em condições ideais ao processo de germinação. Isto foi realizado para permitir que as sementes encontrassem

situação favorável à germinação e a partir disso certificar-se que aquelas sementes que não apresentaram germinação estariam em estágio de dormência. Entretanto, a porcentagem de sementes germinadas na câmara foi relativamente baixa, quando comparada com a porcentagem de sementes germinadas a campo (Figura 12). No primeiro ano, a taxa de germinação em câmara de germinação variou de 1 a 10% entre os genótipos avaliados (Figura 12A). No segundo ano apenas o ecótipo de arroz vermelho AV 501 apresentou elevada taxa de germinação em câmara, superior a 20% (Figura 12B). Esta taxa foi inclusive superior a taxa de germinação apresentada a campo por este ecótipo (Figura 12B). Isto pode indicar que mais de 20% das sementes do ecótipo AV 501 já haviam superado a dormência, mas ainda não havia encontrado situação a campo favorável para germinação. No terceiro ano um número mais expressivo de sementes dos ecótipos de arroz vermelho germinou em câmara de germinação (Figura 12C). Provavelmente as sementes destes ecótipos também já haviam superado a dormência, entretanto ainda não tinham encontrado condições para germinar.

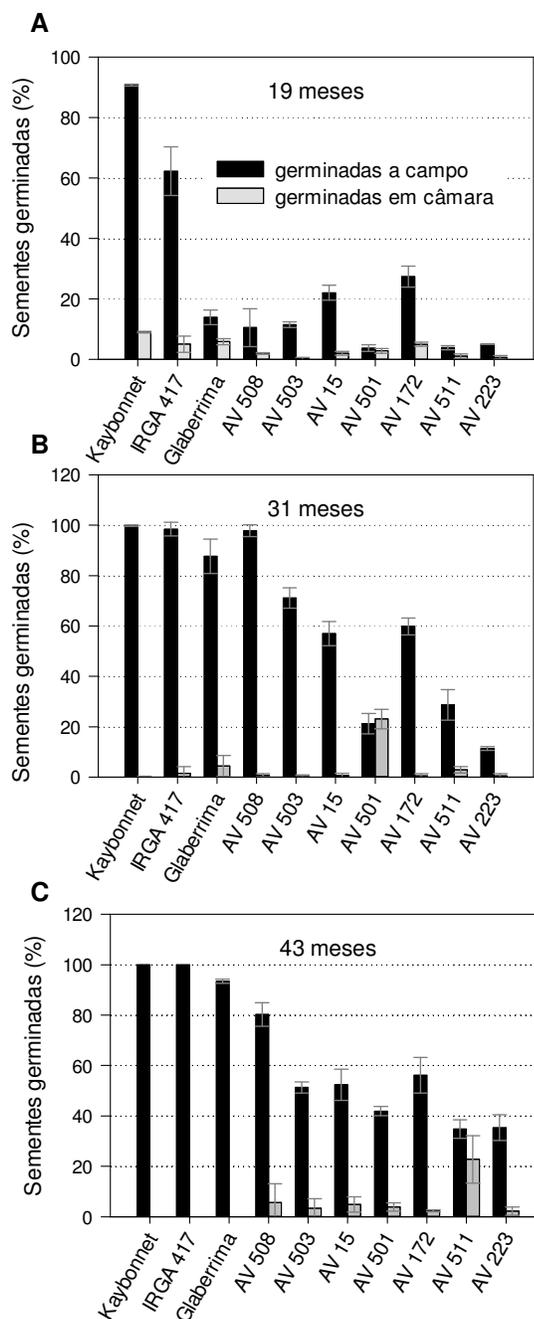


FIGURA 12. Comparação da taxa de germinação das sementes de genótipos de arroz germinadas a campo e em condições ideais (câmeras). Primeiro ano, 19 meses após deposição no solo (A); Segundo ano, 31 meses após deposição no solo (B); Terceiro ano, 43 meses após deposição no solo (C).

Outro trabalho também avaliou o nível de germinação de cultivares de arroz e ecótipos de arroz vermelho provenientes do sul do Brasil, porém em um espaço menor de tempo (Schawanke *et al.*, 2008). As sementes de arroz

vermelho mantidas em temperatura ambiente por 36 dias apresentaram germinação próximo de zero para a maioria dos ecótipos testados. Na mesma avaliação, duas cultivares comerciais, BR-IRGA 409 e El Paso L 144, mostraram porcentagem de germinação superior a 90% (Schawanke *et al.*, 2008).

As sementes dos ecótipos de arroz vermelho apresentaram processo de germinação ao longo de todo o período de estudo, enquanto que nas cultivares de arroz a germinação ocorreu principalmente no primeiro ano. Isto mostra que de fato o arroz vermelho possui capacidade de persistir no solo por alguns anos, antes de iniciar o processo de germinação. Este é um dos fatores que faz do arroz vermelho a planta daninha com maior importância na cultura arroz. Pois além de permitir que as sementes permaneçam viáveis no solo, ocasiona a germinação, emergência, crescimento e desenvolvimento escalonado desta planta daninha, o que dificulta o seu controle (Delouche *et al.*, 2007).

Com relação à análise da dormência das sementes, efetuada nos anos de 2010, 2011 e 2012, verificou-se que foram significativos os efeitos simples de genótipos e período de permanência das sementes no solo, e ainda, foi significativa a interação entre estes dois fatores (Apêndice 3A). Na avaliação realizada em outubro de 2010, após 19 meses que as sementes foram enterradas no solo, foi possível verificar a existência de genótipos com níveis distintos de dormência (Tabela 8). Nos ecótipos AV 223, AV 501, AV 503, AV 508 e AV 511 a dormência foi superior a 80%. Estes genótipos foram os que apresentaram o maior nível de dormência, composto inteiramente por genótipos de arroz vermelho (Tabela 8). Os ecótipos AV 15 e AV 172, juntamente com a espécie *O. glaberrima*, apresentaram taxa de dormência moderada, que variou de 60 a 70% (Tabela 8). A menor taxa de dormência foi apresentada pelas cultivares IRGA 417 e Kaybonnet (Tabela 8). Desta forma, já no primeiro ano fica evidente que as

sementes de arroz vermelho possuem maior nível de dormência.

TABELA 8. Análise da dormência das sementes dos ecótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e espécie silvestre *O.glaberrima*, no primeiro, segundo e terceiro ano de estudo.

Genótipos	Tempo após deposição das sementes no solo								
	Primeiro Ano (2010)			Segundo Ano (2011)			Terceiro Ano (2012)		
	19 meses			31 meses			43 meses		
	----- Dormência das sementes (%) -----								
AV 15	AB*	69,3	a	B	11,0	b	AB	31,4	c
AV 172	B	57,6	a	B	15,1	b	C	11,7	b
AV 223	AB	79,6	a	A	59,8	b	A	49,3	b
AV 501	A	87,9	a	B	14,4	c	AB	32,6	b
AV 503	A	84,6	a	B	17,4	b	B	27,7	b
AV 508	AB	81,6	a	C	1,4	c	C	9,8	b
AV 511	A	91,7	a	A	64,6	b	A	40,3	b
Glaberrima	AB	67,5	a	C	0,0	b	D	0,0	b
IRGA417	C	28,3	a	C	0,0	b	D	0,0	b
Kaybonnet	D	0,1	ns	C	0,0		D	0,0	
CV ¹ (%)									23,4

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e antecedidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹ Coeficiente de variação.

Quando comparado o primeiro com o segundo ano, é possível verificar redução na taxa de dormência das sementes em praticamente todos os genótipos avaliados, apenas a cultivar Kaybonnet se manteve constante, pois já havia apresentado 0% de dormência no primeiro ano (Tabela 8). Após dois anos e sete meses presentes no banco de sementes do solo, as cultivares apresentaram praticamente 100% de suas sementes germinadas, grande parte germinada a campo (Figura 12B) e conseqüentemente 0% de dormência. Nas sementes da espécie silvestre a taxa de dormência foi inferior a 5%, sendo juntamente com as cultivares de arroz e com o ecótipo AV 508, classificadas como de baixo nível de dormência. Com relação aos ecótipos de arroz vermelho, destaca-se o AV 508 que apresentou pronunciada redução da taxa de dormência do primeiro para o segundo ano. No primeiro ano, este ecótipo apresentou taxa de dormência superior a 80% e no segundo ano, esta taxa reduziu para menos de 5% (Tabela 8). Os ecótipos AV 15, AV 501, AV 503 e AV 172 apresentaram dormência

intermediária. Já os ecótipos AV 223 e AV 511, apresentaram alto nível de dormência, com taxas superiores a 60% (Tabela 8). Muito embora os resultados obtidos sejam importantes para a quantificação da dormência ao longo do tempo, o principal objetivo desse trabalho foi obter a variabilidade dessa característica entre os genótipos avaliados. Com base nos resultados obtidos nas avaliações realizadas no primeiro e no segundo ano foram selecionados os fenótipos contrastantes para o estudo de expressão de genes.

No terceiro ano, verificou-se que as cultivares analisadas apresentaram 100% de suas sementes germinadas (Figura 12 e Tabela 7). A espécie silvestre *O. glaberrima* mostrou comportamento semelhante as cultivares e apresentou 0% de sementes dormentes (Tabela 8), já que as poucas sementes que não estavam germinadas, apresentavam inviabilidade do embrião através do teste de tetrazólio (Tabela 9). Nos ecótipos de arroz vermelho ainda foi possível observar sementes não germinadas, ou seja, três anos e sete meses após a disposição destas sementes no solo, ainda existiam sementes com capacidade de germinar (Tabela 8). Isto mostra que o caráter dormência tem papel significativo na perpetuação desta espécie daninha. A distribuição da germinação ao longo do tempo aumenta a probabilidade de que algumas das sementes germinarão quando as condições são favoráveis para o estabelecimento e a conclusão do ciclo de vida da espécie (Delouche *et al.*, 2007). Ainda, no terceiro ano verificou-se que a taxa de dormência dos ecótipos de arroz vermelho analisados apresentavam taxa de dormência que variava de 10 a 50%. Mesmo que valores de dormência próximos a 10% possam ser considerados baixos, devemos levar em consideração que grande parte das lavouras orizícolas apresenta limitada adoção de sistemas de rotação de culturas (Gomes & Magalhães Jr, 2004), o que indica que todo ano o banco de sementes é renovado, e intensifica o problema de controle de arroz

vermelho.

Através dos dados apresentados acima é possível verificar que o comportamento e intensidade da dormência ao longo do tempo são variáveis, e que estas variações também ocorrem dentro dos ecótipos de arroz vermelho, como por exemplo, o ecótipo AV 508 que mostrou comportamento diferente dos demais ecótipos de arroz vermelho analisados. Ainda, a variação da dormência pode ocorrer inclusive em sementes advindas de uma mesma planta, ou da mesma panícula (Delatorre, 1999). Esta variação pode ser em questões de dias, ou até anos, o que torna este mecanismo de sobrevivência bastante eficiente (Delouche *et al.*, 2007). Isto torna a fenotipagem uma etapa importante no estudo da dormência, pois para que este caráter seja melhor compreendido e principalmente para possibilitar análises moleculares é imprescindível que se tenha conhecimento do fenótipo apresentado por cada genótipo em estudo.

As diferenças fenotípicas ocorrem em função das diferenças genéticas e também das condições ambientais vigentes durante o desenvolvimento das sementes (Delatorre, 1999). Ainda, estudos indicam que a pigmentação do tegumento e demais camadas, tais como o pericarpo, também podem ocasionar alterações na dormência e longevidade das sementes (Finkelstein *et al.* 2008). As sementes de arroz pigmentadas, como as sementes de arroz vermelho, apresentam maior dormência quando comparadas aquelas com ausência do pigmento (Leopold *et al.*, 1988). Isto ocorre devido à ação de pigmentos flavonóides presentes nas sementes que atenuam o processo de deterioração, pois podem restringir a disponibilidade de oxigênio, inibindo processos metabólicos de pós-maturação e germinação (Winkel-Shirley, 2002). Os flavonóides podem fornecer a função antimicrobiana e a proteção contra radiação ultravioleta e dano oxidativo (Finkelstein *et al.* 2008). Cabe salientar que os

ecótipos de arroz vermelho analisados no presente estudo apresentam pericarpo na cor vermelha.

Maiores níveis de dormência também foram verificados em ecótipos de arroz vermelho quando comparados às cultivares de arroz (Do Lago *et al.*, 1982; Noldin *et al.*, 2006). Um estudo desenvolvido nos Estados Unidos verificou que sementes de nove ecótipos de arroz vermelho, enterradas a 25 cm da superfície do solo, apresentavam-se dormentes dois anos após sua dispersão no solo, enquanto que as sementes das cultivares, Lemont e Mars, não apresentavam sementes viáveis após cinco meses, independentemente da sua localização no solo (Noldin *et al.*, 2006). Outro trabalho que avaliou a dormência das sementes de 20 ecótipos de arroz vermelho e de quatro cultivares de arroz, também verificou maiores níveis de dormência nas sementes daninhas (Do Lago *et al.*, 1982). Após a colheita das sementes maduras a dormência média das cultivares foi de 86%, enquanto que os ecótipos de arroz vermelho apresentaram média de 99,9% das suas sementes dormentes (Do Lago *et al.*, 1982). No mesmo trabalho algumas sementes foram armazenadas após a colheita por seis meses a 10° C e após este período, foram analisadas. Nesta análise, as cultivares apresentaram 12% de dormência, enquanto que as sementes daninhas apresentaram 36% de dormência (Do Lago *et al.*, 1982). Em um estudo realizado no Brasil, a intensidade da dormência em ecótipos de arroz vermelho e arroz cultivado foi avaliada aos 30 dias após a colheita (Schawanke *et al.*, 2008). As sementes de todos os ecótipos de arroz vermelho apresentavam dormência em porcentagens que variaram de 70 a 100%, enquanto que nas cultivares BR-IRGA 410 e IRGA 417 a porcentagem de sementes dormentes foi de 12 e 18%, respectivamente (Schawanke *et al.*, 2008).

Os trabalhos citados comprovam a existência do caráter de dormência

nas espécies daninhas de arroz, mas também enfatizam a diversidade de níveis de dormência encontrados nesta espécie. Isto está relacionado também com o manejo e momento de análise das sementes. Sementes que foram analisadas após a colheita provavelmente apresentam apenas a dormência primária. Este tipo de dormência existe durante a fase de maturação da semente e atinge um nível elevado em sementes recém-colhidas, reduzindo lentamente durante o armazenamento (Hilhorst, 1998). Aqueles estudos nos quais as sementes são enterradas em grandes profundidades ou quando alguma condição para germinação é faltante, provavelmente a dormência em estudo seja a dormência secundária. Este tipo de dormência ocorre quando a dormência ao invés de reduzir ao longo do tempo, também pode ser re-induzida ou passar a existir em sementes que antes não apresentavam dormência, quando as condições para a germinação, como a luz está faltando (Hilhorst, 1998). Assim, acredita-se que a dormência analisada no presente estudo tenha sido a dormência secundária.

As sementes que não germinaram, mesmo após o processo de superação de dormência, foram avaliadas quanto à viabilidade do embrião. Através desta análise verificou-se que de fato nos três anos de estudo os genótipos apresentaram uma porcentagem de sementes que não germinou, pois seus embriões não estavam mais viáveis (Tabela 9). Assim, com relação à variável de embriões não viáveis observou-se que foram significativos os efeitos simples de genótipos e período de permanência das sementes no solo, e ainda, foi significativa a interação entre os genótipos avaliados e o tempo em que as sementes ficaram presentes no solo (Apêndice 3 C).

TABELA 9. Análise da viabilidade das sementes, sementes não viáveis, dos ecótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e espécie silvestre *O.glaberrima*, no primeiro, segundo e terceiro ano de estudo.

Genótipos	Tempo após deposição das sementes no solo								
	Primeiro Ano (2010)			Segundo Ano (2011)			Terceiro Ano (2012)		
	19 meses			31 meses			43 meses		
	----- Sementes não viáveis (%) -----								
AV 15	NS*	3,0	b	A	19,6	a	AB	11,4	ab
AV 172		17,7	b	A	23,7	ab	A	29,8	a
AV 223		15,3	ns	A	24,8		AB	10,8	
AV 501		2,0	b	A	34,9	a	AB	21,7	a
AV 503		2,6	b	AB	7,7	ab	AB	17,6	a
AV 508		4,6	ns	B	0,0		B	4,1	
AV 511		3,1	ns	AB	3,6		B	2,2	
Glaberrima		6,7	ns	A	8,1		B	6,6	
IRGA417		3,2	ns	B	1,0		B	0,0	
Kaybonnet		0,0	ns	B	0,0		B	0,0	
CV ¹ (%)									23,4

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e antecedidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹ Coeficiente de variação.

Na primeira avaliação desta variável, aos 19 meses após as sementes serem enterradas, não houve variação significativa entre os genótipos quanto ao número de sementes não viáveis (Tabela 9). No segundo ano, aos 31 meses após a deposição das sementes no solo, verificou-se diferença estatística entre genótipos avaliados e foi possível observar que os ecótipos de arroz vermelho AV 15, AV 172, AV 223 e AV 501 apresentaram os maiores valores de embriões não viáveis, que corresponderam 20, 24, 25 e 35%, respectivamente (Tabela 9). Com relação a mesma variável, no terceiro ano, 43 meses após a deposição das sementes no solo, também foi possível verificar diferença estatística entre genótipos avaliados, os maiores valores de sementes não viáveis foram apresentados pelos ecótipos de arroz vermelho (Tabela 9). Verificou-se que os genótipos com maior número de sementes não viáveis foram os ecótipos AV 223, AV 503, AV 501 e AV 172 que apresentaram respectivamente 11, 18, 22 e 30% de sementes não viáveis (Tabela 9). O fato dos ecótipos de arroz vermelho terem apresentado maior número de sementes não viáveis pode estar relacionado ao maior número de sementes no solo, quando comparado às sementes de arroz

cultivado, que no mesmo período já tinham apresentado praticamente 100% de germinação.

Parte dos genótipos avaliados apresentou uma porcentagem mínima de sementes que não germinou após o processo de superação de dormência, mas que possuía embriões viáveis (Tabela 10). Este fato poderia ser explicado pela complexidade do caráter de dormência, ou seja, as sementes não germinadas provavelmente necessitavam de outro estímulo para superar a dormência já que o método utilizado foi apenas a exposição das sementes à temperatura de 50 °C por seis dias.

TABELA 10. Análise da viabilidade das sementes, sementes viáveis, dos ecótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e espécie silvestre *O. glaberrima*, no primeiro, segundo e terceiro ano de estudo.

Genótipos	Tempo após deposição das sementes no solo								
	Primeiro Ano (2010)		Segundo Ano (2011)		Terceiro Ano (2012)				
	19 meses		31 meses		43 meses				
	----- Sementes não viáveis (%) -----								
AV 15	NS*	2,8	ab	A	5,9	a	NS*	0,0	b
AV 172		0,0	ns	B	0,9			0,0	
AV 223		4,0	ns	AB	3,6			2,4	
AV 501		3,1	b	A	13,1	a		0,0	b
AV 503		1,2	ns	B	0,7			0,0	
AV 508		1,2	ns	B	0,0			0,2	
AV 511		0,2	ns	B	0,0			0,0	
Glaberrima		4,1	a	b	0,0	b		0,0	b
IRGA417		1,7	ns	B	0,0			0,0	
Kaybonnet		0,1	ns	B	0,0			0,0	
CV ¹ (%)									21,5

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e antecedidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹ Coeficiente de variação.

As Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 1992) indicam alguns métodos para a superação da dormência, grande parte deles com o uso de elevadas temperaturas. Recomenda-se a pré-secagem das sementes por mais de 96 horas com temperatura de 40°C a 50°C em estufa com circulação de ar. Ainda é sugerida a imersão das sementes em água a 40°C por 24 horas ou, imersão das sementes em solução de Hipoclorito de Sódio a 0,5% por 16 - 24

horas (Brasil, 1992). Outro método recomendado é o pré-aquecimento das sementes a 50°C e após disposição das mesmas em água ou em solução de Nitrato de Potássio (KNO₃), por 24 horas (Brasil, 1992). Além da RAS vários autores têm recomendado o uso de temperaturas elevadas para superação da dormência. Amaral & Gonzalo (1977) sugeriram condições de 49°C por 96 horas. Vieira & Barros (1994) recomendaram a condição de 40°C por 168 horas para a superação da dormência em cultivares de arroz irrigado Inca e MG 1, embora para a primeira cultivar, as temperaturas de 50°C e 60°C foram capazes de superar a dormência em menor tempo. Ainda outros trabalhos sugerem o tratamento com a temperatura de 50°C por 3 a 7 dias (Guimarães *et al.*, 2000). No entanto, temperaturas superiores a 60°C podem inviabilizar o embrião (Menezes *et al.*, 2009), o que torna importante a adoção de temperaturas abaixo deste limite como forma de não interferir com os resultados em avaliação. Os trabalhos acima confirmam que a utilização de calor é eficiente para a superação da dormência em sementes de arroz. No entanto, a mesma temperatura pode não ser eficaz para todas as sementes, já que cada trabalho indica uma temperatura e período de exposição diferente. Isto pode indicar que as sementes do presente estudo, que não apresentaram germinação, mas que possuem seus embriões viáveis necessitam de outro método ou de algum ajuste específico de temperatura e/ou de exposição para a superação da dormência. Isto comprova a complexidade do caráter de dormência.

Com relação aos tratamentos baseados na utilização de elevadas temperaturas, acredita-se que o calor promova a oxidação dos compostos presentes, principalmente na casca, que competem com o embrião pelo O₂ (Seshu & Dadlani, 1991). Outros autores acreditam que a casca das sementes de arroz impede a penetração de oxigênio para que se realize o processo

germinativo e que, também a casca, consome o oxigênio deixando-o indisponível para o embrião (Bewley & Black, 1994). À medida que a dormência vai desaparecendo durante o armazenamento, o consumo de oxigênio pela casca diminui. Isto leva a crer que a casca impõe a dormência, impossibilitando o embrião de absorver oxigênio (Peske *et al.*, 1997). No entanto este fato ainda não está comprovado, e por este motivo, o presente estudo avaliou a germinação das sementes dos genótipos de arroz na presença e na ausência da casca.

A análise de germinação das sementes com e sem casca foi realizada seis meses após a colheita destas sementes. Através desta análise foi possível verificar que não houve variação significativa entre a germinação de sementes com e sem casca (Figura 13 – Apêndice 4). Isto mostra que para os genótipos avaliados nas condições citadas, a casca não influencia na germinação das sementes e possivelmente não influencia na dormência das mesmas. No entanto, é possível verificar diferença significativa na germinação dos genótipos avaliados. Nesta análise, aos seis meses após a colheita das sementes, os ecótipos AV 223 e AV 511 apresentaram menores taxas de germinação, que variou entre 20 e 40%. Enquanto que a espécie silvestre *O. glaberrima* e as cultivares Kaybonnet e IRGA 417 apresentaram os maiores níveis de germinação (Figura 13). Estes dados confirmam os resultados obtidos durante o estudo do comportamento das sementes ao longo dos três anos (Tabela 7 e 8), que mostraram que os ecótipos AV 223 e AV 511 apresentam alta dormência e por isso são fenótipos contrastantes da espécie silvestre *O. glaberrima* e pelas cultivares Kaybonnet e IRGA 417, que apresentam baixa dormência.

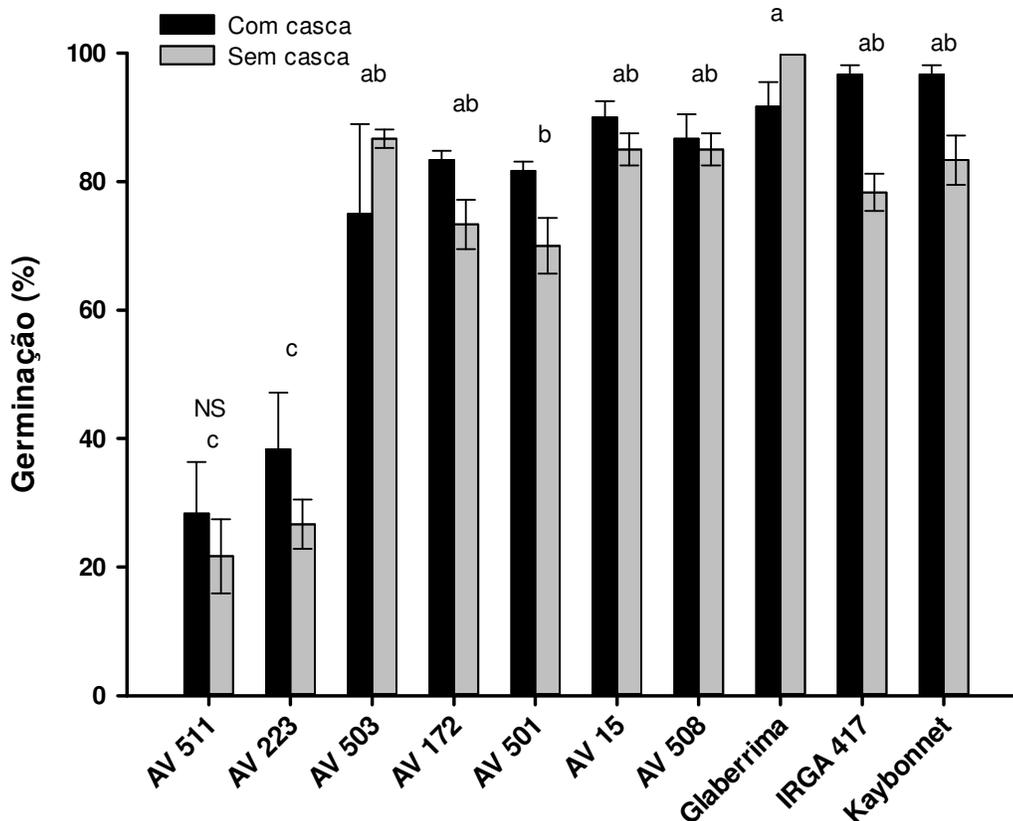


FIGURA 13. Taxa de germinação de sementes com e sem casca dos genótipos de arroz aos seis meses após a colheita das sementes. Médias e desvio padrão apresentados. Letras minúsculas comparam os genótipos avaliados, letras maiúscula comparam os genótipos com e sem casca pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Porto Alegre, RS. 2013.

4.2.2 Expressão de genes relacionados à dormência das sementes

Os genes *OsCYP707A5*, *OsMADS29* e *Sdr4* são relatados como envolvidos no caráter de dormência em trabalhos na literatura (Sugimoto *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011b). Entretanto, nos estudos já apresentados estes genes tiveram sua expressão avaliada apenas em cultivares de arroz, ecótipos de arroz vermelho não foram analisados quanto à expressão destes genes. Ainda, diferentemente do presente estudo, a expressão dos genes em questão foi analisada somente em determinadas etapas no desenvolvimento da semente. A expressão do gene *Sdr4* foi avaliada 14 dias após a antese e em outras partes da planta, não correspondentes a semente (Sugimoto *et al.*, 2010).

O gene *OsCYP707A5* foi avaliado em sementes maduras, seis meses após a colheita (Liu *et al.*, 2011). Já o gene *OsMADS29* teve sua expressão avaliada em sete períodos, no entanto, todos eles durante o processo de germinação das sementes (Li *et al.*, 2011a). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão relativa dos genes *OsCYP707A5*, *OsMADS29* e *Sdr4* em etapas fisiológicas distintas da semente, de forma a verificar o comportamento destes genes desde a formação do embrião até a germinação visível, e apontar o possível papel no caráter dormência das sementes de arroz vermelho. Assim, as análises da expressão foram realizadas no período de formação do embrião, aos 14 dias após a antese; quando o embrião encontrava-se em estágio maduro, aos seis meses após a colheita das sementes; e quando as sementes estavam em processo de germinação às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após exposição à germinação.

As análises de expressão foram realizadas em sete genótipos de arroz, escolhidos através dos resultados obtidos na fenotipagem, descritos no item 4.2.1. A fenotipagem foi realizada ao longo de três anos e sete meses, no entanto, os fenótipos contrastantes foram escolhidos baseados nos resultados obtidos no segundo ano, após 31 meses da deposição das sementes no solo. Através da análise fenotípica foi possível identificar os fenótipos contrastantes, que compreendem nos ecótipos AV 511 e AV 223, que apresentaram alta dormência das sementes, o ecótipo AV 503 que apresentou dormência intermediária, e quatro genótipos que apresentaram baixa dormência, o ecótipo AV 508, a espécie *O. glaberrima*, e as cultivares IRGA 417 e Kaybonnet.

O gene *OsCYP707A5* pertence a família CYP707A e codifica ABA 8`-hidroxilase, que participa do catabolismo de ABA (Okasaki *et al.*, 2012). Estudos genéticos têm mostrado que ABA quando produzido por tecidos maternos ou

exógenos não é suficiente para induzir a dormência, o que faz com que este tipo de dormência dependa da síntese de ABA no embrião e/ou endosperma (Finkelstein *et al.*, 2008). Assim, a região escolhida para avaliar a expressão relativa dos genes em estudo foi a região do embrião. A primeira análise foi realizada no momento em que as sementes apresentavam-se em formação, ou seja, 14 dias após a antese. Neste momento verificou-se que o gene *OsCYP707A5* foi expresso em todos os genótipos analisados (Figura 14). No entanto, não foi possível verificar relação da expressão do gene *OsCYP707A5* com o caráter de dormência das sementes, pois genótipos contrastantes apresentaram nível semelhante de expressão relativa (Figura 14). O ecótipo AV 511, que apresenta alta dormência, apresentou expressão relativa próxima a cultivar Kaybonnet, que apresenta baixa dormência. O mesmo ocorreu com o ecótipo AV 223 e a cultivar IRGA 417 que apresentam fenótipos contrastantes, mas que apresentaram expressão relativa semelhante, próxima de 0,75 (Figura 14).

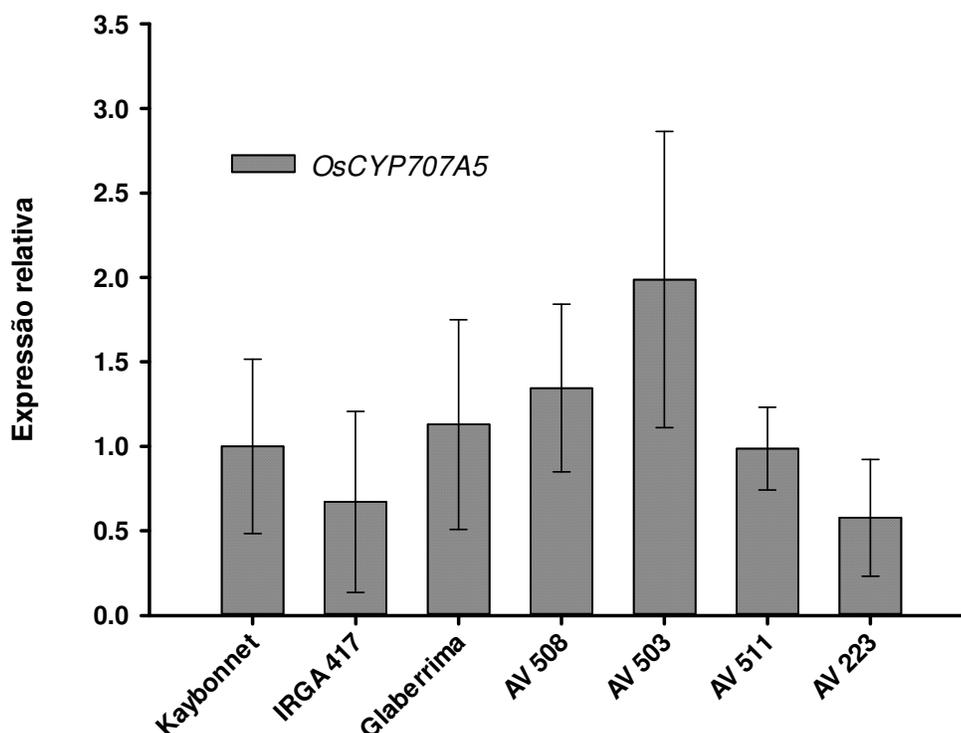


FIGURA 14. Expressão relativa do gene *OsCYP707A5* na região do embrião em formação em sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

A expressão relativa do gene *OsCYP707A5* em sementes maduras, seis meses após a colheita, também não apresentou relação com o caráter de dormência (Figura 15). As cultivares Kaybonnet e IRGA 417 mostraram nível de expressão relativa bastante semelhante. O ecótipo AV 511 apresentou expressão relativa 80 vezes superior as cultivares Kaybonnet e IRGA 417. No entanto, os fenótipos contrastantes *O. glaberrima* e AV 223, diferentemente do esperado, apresentaram expressão relativa semelhante (Figura 15). Isto surge que provavelmente o gene *OsCYP707A5* não está envolvido com o caráter em estudo. Ainda, não foi possível verificar expressão do ecótipo AV 503 neste momento da análise. As mesmas amostras apresentaram expressão para o controle endógeno 28S rRNA, no entanto, para o gene *OsCYP707A5* a curva de

amplificação não formou-se corretamente e foi possível observar a formação de vários picos na curva de dissociação, o que indica a formação de produtos inespecíficos.

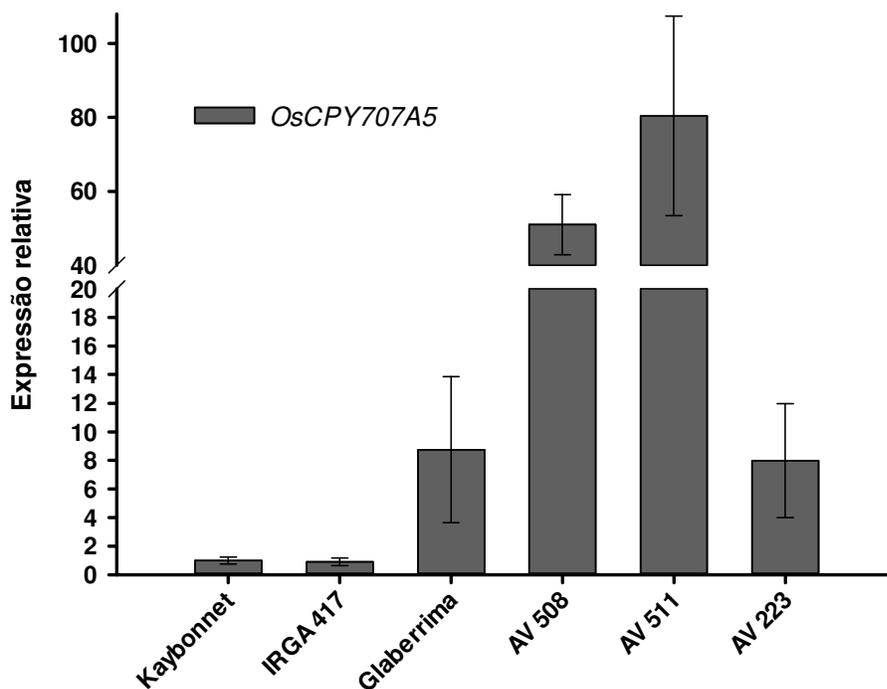


FIGURA 15. Expressão relativa do gene *OsCYP707A5* na região do embrião maduro das sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

O gene *OsCYP707A5* teve também sua expressão relativa avaliada durante o processo de germinação das sementes, às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação. Entretanto este gene não apresentou amplificação na região do embrião durante o processo de germinação. Na mesma avaliação foi possível visualizar que todas as quadruplicatas e repetições, dos genótipos testados, apresentavam expressão para o controle endógeno 28S rRNA. Enquanto que para o gene *OsCYP707A5* a curva de amplificação não formou-se corretamente e ainda, foi possível verificar a formação de vários picos na curva de dissociação, o que indica a formação de produtos inespecíficos.

Na figura 16 é possível verificar as etapas de germinação observadas em cada genótipo no momento em que foram realizadas as coletas para a análise de expressão, às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação (HAEG). As sementes colocadas para germinar não estavam mais em estado de dormência, pois foram submetidas a métodos de superação de dormência, descritos no item 3.2.3.1. No entanto, através da Figura 16, é possível observar que mesmo utilizando sementes não dormentes, verificaram-se diferenças na velocidade com que ocorreram as etapas de germinação em cada genótipo.

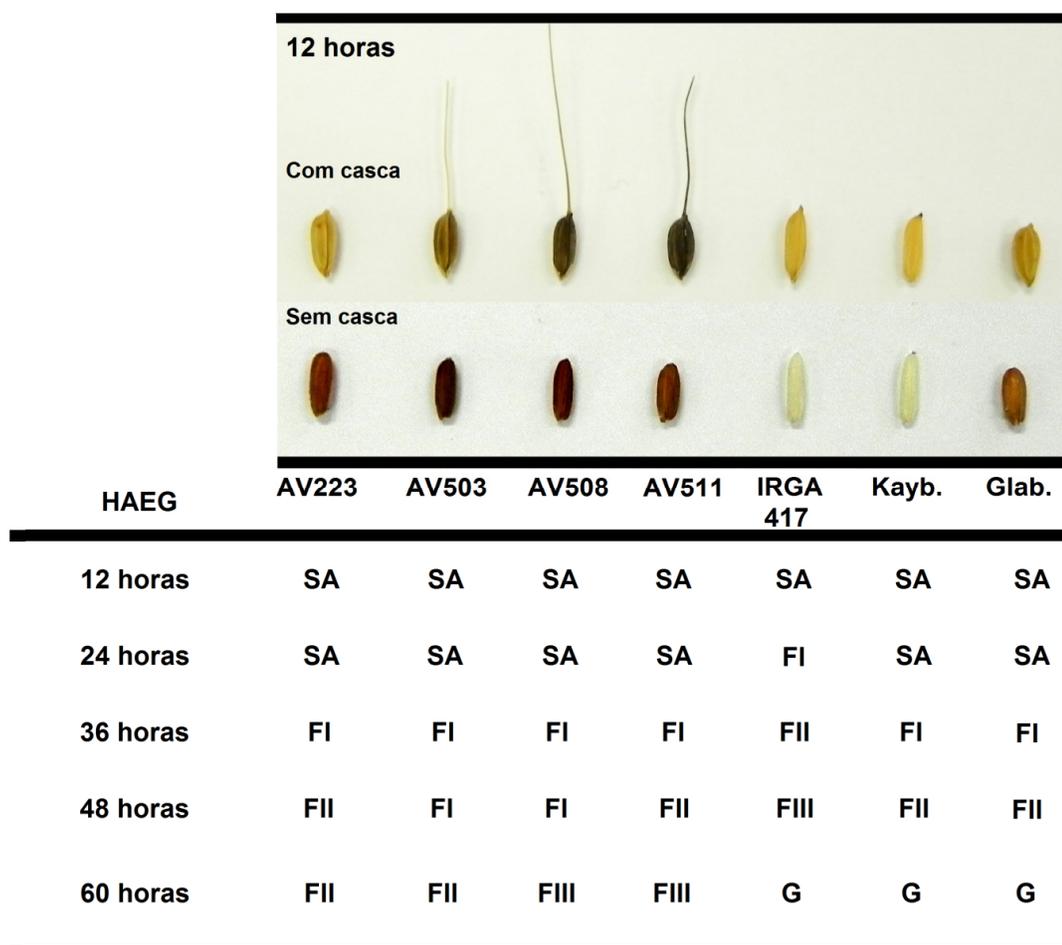


FIGURA 16. Etapas de germinação dos genótipos de arroz, observados às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação (HAEG). Sementes sem alteração (SA), em fase I de embebição (FI), fase II de platô (FII), exposição da radícula na fase III (FIII) e germinação com presença de radícula >1mm (G). Porto Alegre, RS. 2013.

No primeiro momento, às 12 HAEG, a diferença na velocidade de germinação ainda não foi visível, pois as sementes de todos os genótipos mostravam-se sem alterações (SA) (Figura 16). Já às 24 HAEG a cultivar IRGA 417 apresentava-se em fase de embebição (FI), enquanto que as sementes dos demais genótipos continuavam na fase SA. Às 36 HAEG as sementes da cultivar IRGA 417 aumentaram de tamanho e foram classificadas em fase II de platô (FII), as sementes dos demais genótipos estavam em FI (Figura 16). Às 48 HAEG foi possível evidenciar claramente a diferença de velocidade de germinação, pois enquanto as sementes de alguns genótipos como AV 503 e AV 508 continuavam em FI, outros genótipos, AV 223, AV 511, Kaybonnet e *O.glaberrima* estavam em FII. Neste mesmo momento a cultivar IRGA 417 apresentava-se na fase III (FIII) (Figura 16), onde ocorre um aumento adicional na absorção de água, que acontece quando o eixo embrionário alonga e rompe as camadas que envolvem a semente (Manz *et al.*, 2005). Às 60 HAEG os genótipos AV 223 e AV 503 permaneciam em FII, os genótipos AV 503 e AV 511 estavam em FIII e os genótipos IRGA 417, Kaybonnet e *O.glaberrima* já haviam germinado, com presença de radícula >1mm (G) (Figura 16). Acredita-se que existe muita variação relacionada à velocidade com que as sementes podem germinar (Alonso-Blanco *et al.*, 2003). Ainda, a germinação das sementes de arroz indica é geralmente mais rápida do que a germinação em sementes de arroz japônica, o que é inclusive utilizado como uma das características para distinguir as duas subespécies (Miura *et al.*, 2002), e pode refletir numa variação genética específica para a adaptação aos ambientes. A velocidade de germinação é reconhecida como resultado da interação entre genes e ambientes específicos (Alonso-Blanco *et al.*, 2003). Isto mostra que em cada fase da germinação pode existir variações nos níveis de expressão dos genes envolvidos neste processo. No entanto, em

muitos trabalhos estas diferenças não são consideradas, pois são realizadas apenas análises de presença e ausência de germinação e elas não abordam as fases deste processo.

A expressão do gene *OsCYP707A5* em embriões de sementes de arroz cultivado, seis meses após a colheita das sementes, foi relacionada ao maior índice de dormência das sementes (Liu *et al.*, 2011). Neste estudo, apenas as cultivares 9311 e Pei-Ai 64s (PA64s) foram avaliadas por apresentarem taxa de germinação contrastantes nas primeiras 48 horas, 60 e 30% de germinação, respectivamente (Liu *et al.*, 2011). Aos seis meses após a colheita das sementes, a cultivar 9311 apresentava concentração de ABA inferior a cultivar PA64s, as cultivares apresentavam concentrações de 1000 ng.g⁻¹ e 1800 ng.g⁻¹, respectivamente. A expressão gênica de *OsCYP707A5* era quatro vezes superior na cultivar 9312 quando comparada a cultivar PA64s (Liu *et al.*, 2011). No entanto, 60 horas após a exposição à germinação as taxas de germinação das duas cultivares analisadas eram muito próximas, as cultivares PA64s e 9311 apresentaram aproximadamente 70 e 75% de germinação, respectivamente (Liu *et al.*, 2011). As informações acima mostram que o gene *OsCYP707A5* pode estar envolvido no catabolismo de ABA. No entanto, não fica evidente que este gene tenha ação sobre o caráter de dormência, já que as cultivares testadas não parecem ter diferenças claras nos níveis de dormências de suas sementes.

O presente estudo não avaliou o teor de ABA nas sementes, e desta forma, não é possível descartar o envolvimento deste gene com o catabolismo de ABA. Até o presente momento, o único trabalho que verificou a relação deste gene com o caráter de dormência nas sementes de arroz foi realizado por Liu *et al.* (2011). No entanto, estes testes foram realizados apenas em cultivares de arroz (Liu *et al.*, 2011).

Outros trabalhos foram realizados com a família gênica CYP707A, entretanto grande parte deles em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Kushiro *et al.*, 2004; Millar *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2006). Na espécie *A. thaliana*, estudos de expressão gênica mostraram que o gene *AtCYP707A2*, gene da família CYP707A, foi associado com o rápido declínio de ABA na germinação das sementes (Kushiro *et al.*, 2004). Estes estudos também indicam que o aumento na biossíntese de ABA pode levar a uma maior dormência das sementes (Kushiro *et al.*, 2004). Em *A. thaliana*, depois do amadurecimento das sementes, há rápida diminuição nos níveis de ABA, o que proporciona a germinação das sementes (Ali-Rachedi *et al.*, 2004).

Existem várias vias catabólicas alternativas para a inativação de ABA (Kushiro *et al.*, 2004). No entanto, a hidroxilação de ABA na posição 8` para produzir 8`ABA-hidroxi, que isomeriza-se de forma espontânea para ácido faséico, é considerado o caminho predominante do catabolismo de ABA (Nambara & Marion-Poll, 2005). Tanto em cevada (*Hordeum vulgare* L.) quanto em *Arabidopsis*, a diminuição de ABA durante a embebição das sementes é associado com o aumento do ácido faséico (Jacobsen *et al.*, 2002; Kushiro *et al.*, 2004). A reação é catalisada por uma enzima citocromo P450 monooxygenase conhecida como ABA-8`-hidroxilase (ABA8`OH) (Millar *et al.*, 2006). Os genes *AtCYP707A1-AtCYP707A4* de *Arabidopsis* foram descritos como codificadores de ABA8`OH (Kushiro *et al.*, 2004). Acredita-se que ABA-8`-hidroxilase catalisa o primeiro passo da degradação oxidativa do ácido abscísico e é considerada a enzima fundamental no controle da taxa de degradação deste hormônio (Cutler *et al.*, 1997).

Através das informações apresentadas em outros trabalhos é possível verificar que ABA está envolvido em processos de dormência das sementes e que

o gene *OsCYP707A5* possui envolvimento com a síntese de ABA-8'- hidroxilase. Entretanto, o presente estudo não encontrou relação do nível de expressão de *OsCYP707A5* com o caráter de dormência nos genótipos de arroz vermelho, cultivares e espécie silvestre testados. Isto, no entanto, não elimina a possibilidade de relação deste gene com a síntese de ABA-8'- hidroxilase, já que os níveis de ABA não foram quantificados nos genótipos avaliados.

O gene *OsMADS29* apresentou expressão relativa na região do embrião no momento em que este encontrava-se em formação, aos 14 dias após a antese (Figura 17). Os maiores valores da expressão relativa foram observados na espécie silvestre *O. glaberrima* e nas cultivares de arroz, Kaybonnet e IRGA 417, que apresentaram respectivamente, expressão relativa de 27, 26 e 21 vezes superior ao ecótipo de arroz vermelho AV 223, utilizado como controle (Figura 17). Contrariamente, a menor expressão relativa foi observada nos ecótipos de arroz vermelho que apresentaram maior nível de dormência (Figura 17). Isto sugere que o gene *OsMADS29* pode estar envolvido nos processos de germinação das sementes e que a expressão deste gene pode contribuir para o formação de sementes sem dormência ou com baixa dormência.

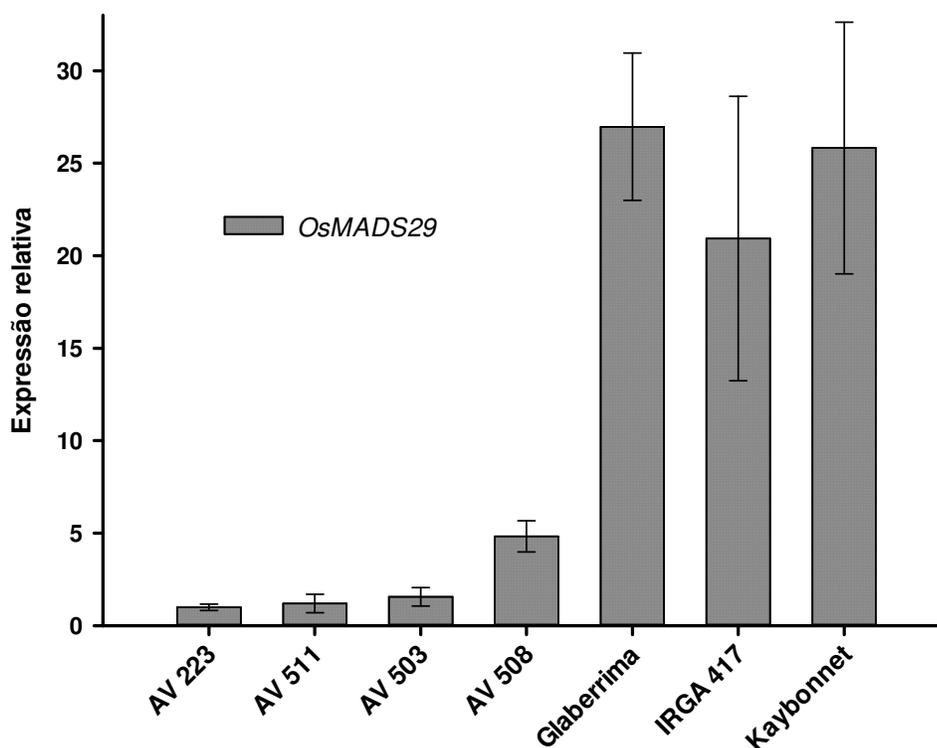


FIGURA 17. Expressão relativa do gene *OsMADS29* na região do embrião em formação das sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

O gene *OsMADS29* também apresentou expressão na região do embrião em sementes maduras, aos seis meses após a colheita. Esta expressão foi novamente superior nas cultivares de arroz e na espécie silvestre e inferior nas sementes dos ecótipos de arroz vermelho (Figura 18). Inclusive, a expressão relativa do gene *OsMADS29* nas cultivares de arroz foi ainda superior aquela verificada nas sementes em formação (Figura 17). Quando as sementes estavam em formação a expressão relativa do gene *OsMADS29* nas cultivares e na espécie silvestre variou entre 21 a 27 (Figura 17). Já nas sementes maduras, seis meses após a colheita, a expressão relativa foi de 80 a 150 vezes superior ao controle AV 223 (Figura 18). Ainda na Figura 18 é possível verificar que o ecótipo AV 508 teve expressão relativa semelhante as cultivares de arroz e a espécie

silvestre. Isto poderia explicar o seu comportamento semelhante as cultivares, apresentado no segundo ano da fenotipagem (Tabela 8).

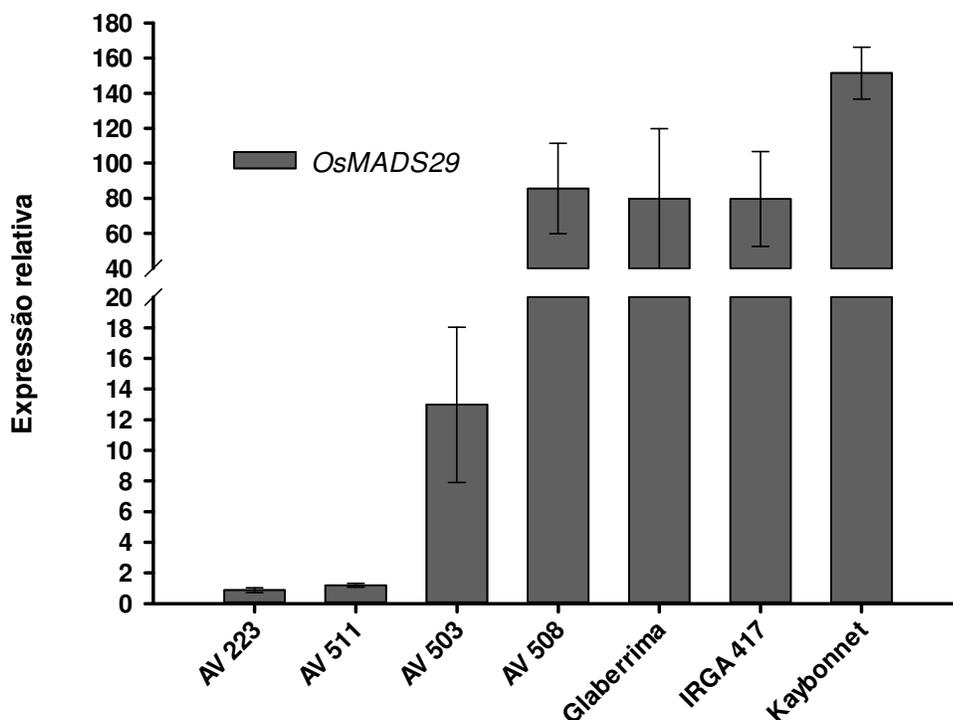


FIGURA 18. Expressão relativa do gene *OsMADS29* na região do embrião maduro em sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

Verificou-se expressão do gene *OsMADS29* na região do embrião no processo de germinação das sementes analisadas às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação. Através da Figura 19 é possível verificar que a expressão do gene *OsMADS29* variou entre os genótipos avaliados, e os genótipos também apresentaram níveis diferentes de expressão relativa ao longo do processo de germinação. Observou-se que a expressão relativa apresentada pelos genótipos durante às 12 e 24 horas após embebidas foi muito semelhante. Ainda, nas primeiras 24 horas as cultivares e a espécie silvestre *O. glaberrima* apresentaram maior expressão relativa (Figura 19 A e B). Às 36 horas verifica-se

redução da expressão relativa da cultivar IRGA 417 e aumento da expressão relativa do ecótipo AV 511 que apresenta expressão relativa 9 vezes maior que a cultivar controle, Kaybonnet (Figura 19C). Às 48 horas, o ecótipo AV 511 apresentou elevação no nível de expressão relativa, ficando 30 vezes superior a cultivar Kaybonnet. Neste mesmo momento, o ecótipo AV 503 também apresentou pronunciada expressão relativa. Cabe ressaltar que, nesta análise não foi possível quantificar a expressão no ecótipo AV 508 (Figura 19D), pois a curva de amplificação não formou-se de modo correto e observou-se ainda a formação de vários picos na curva de dissociação, indicando a formação de produtos inespecíficos. Na última avaliação do processo de germinação, às 60 horas após expostas à germinação em água, apenas o ecótipo AV 503 não havia reduzido sua expressão (Figura 19E).

Na Figura 19 ainda é possível salientar que a expressão relativa do gene *OsMADS29* não foi constante ao longo do processo de germinação nos genótipos avaliados, que apresentaram picos maiores de expressão em etapas distintas. Cabe ressaltar que os genótipos analisados iniciaram as fases FI, FII, FIII e G em etapas diferentes (Figura 16). Isto sugere que a expressão do gene *OsMADS29* pode estar relacionada a determinadas fases da germinação que influenciam na velocidade desta, nas fases FI, FII, FIII e G. O estudo realizado por Alonso-Blanco *et al.* (2003) afirma que existe pronunciada variação na velocidade de germinação das sementes, que é resultado da interação entre genes e ambientes específicos. Isto poderia sugerir que a expressão do gene *OsMADS29* está relacionada a etapas específicas da germinação, já que outro estudo, verificou em gel de agarose, que o tempo necessário para percepção inicial da expressão do gene *OsMADS29* correspondeu estreitamente com o tempo necessário para a emissão da radícula (Li *et al.*, 2011a).

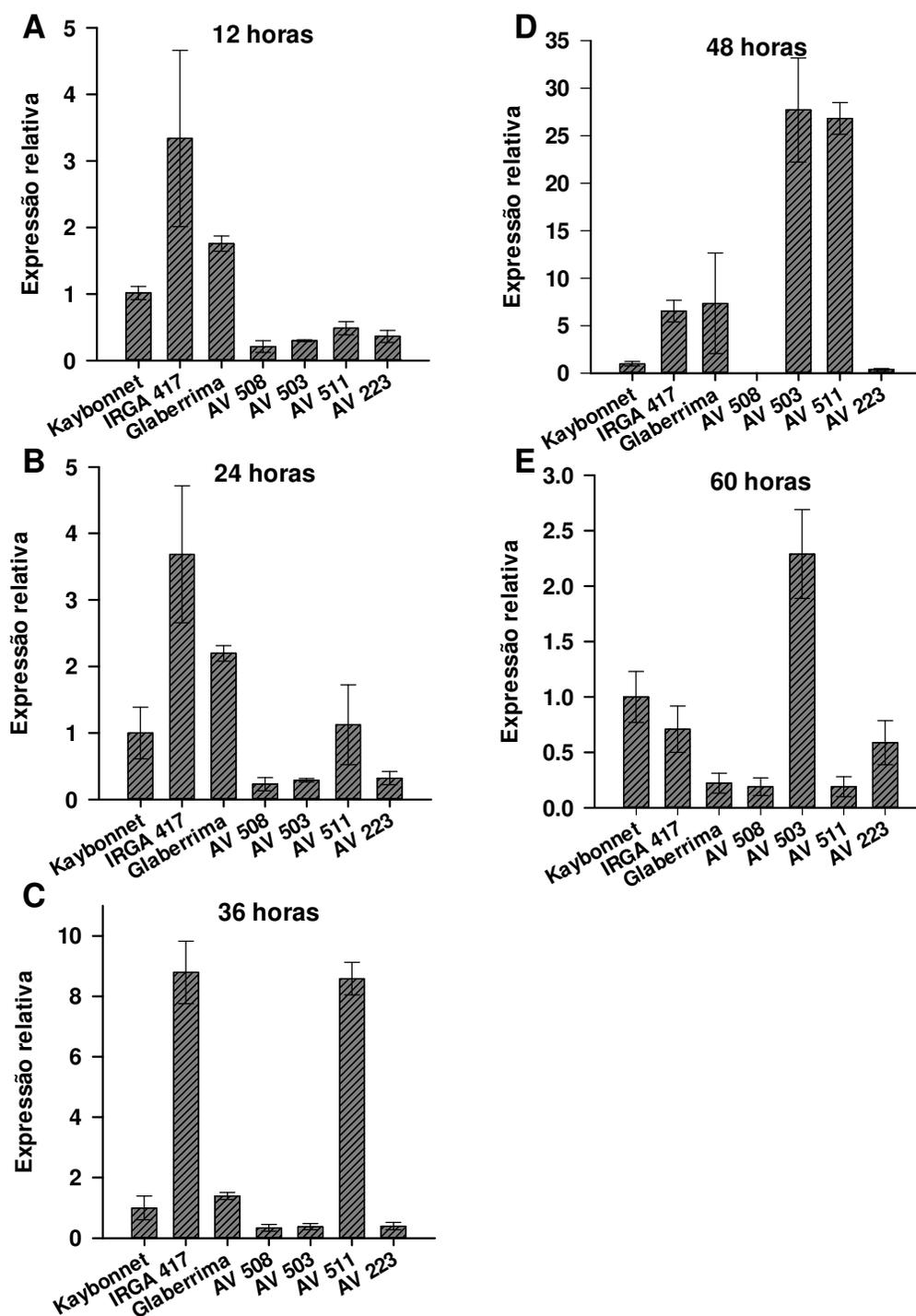


FIGURA 19. Expressão relativa do gene *OsMADS29* em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*, na região do embrião em processo de germinação, às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

O estudo que avaliou a F2 provinda de um cruzamento de uma variedade japônica (alta dormência) com uma variedade indica (baixa dormência) confirmou a relação do *qGR2* com a ausência do caráter de dormência e identificou três genes putativos presentes neste QTL (Li *et al.*, 2011b). Dois destes genes, *Loc_Os02g07410* e *Loc_Os02g07420*, não foram expressos durante a germinação de sementes, em nenhuma das linhagens estudadas. O outro gene, chamado de *OsMADS29*, apresentou expressão elevada em espiguetas, panículas e pouca expressão em brotos, folhas e raízes, indicando que o gene, pode estar relacionado com o caráter de dormência das sementes, pois é expresso preferencialmente durante a maturação e germinação das sementes (Li *et al.*, 2011a). Outro estudo relacionado ao *OsMADS29* verificou também que este gene é preferencialmente expresso em tecidos reprodutivos e apresenta pouca ou nenhuma expressão em tecidos vegetativos (Yin & Xue, 2012). Verificou-se que *OsMADS29* apresentou expressão na flor (antera e ovário) e sementes em desenvolvimento, especialmente depois da antese, mas não foi detectável em tecidos vegetativos, como raízes, brotos e folhas (Yin & Xue, 2012).

A família do fator de transcrição MADS box é caracterizada pela presença de um domínio MADS box de ligação na região N-terminal (Shore & Sharrocks, 1995). Os fatores de transcrição MADS box são reguladores críticos do desenvolvimento reprodutivo do arroz (Yin & Xue, 2012). A repressão de *MADS29* resulta no desenvolvimento de sementes anormais (Yin & Xue, 2012). Estas sementes apresentaram desenvolvimento anormal, taxa de enchimento de grãos baixa, suprimida biossíntese de amido, e o amido contido apresentava grânulos anormais (Yin & Xue, 2012). Isto está de acordo com a expressão de *OsMADS29* observada no presente estudo, que apresentou expressão nas sementes em

formação, aos 14 dias após a antese, em sementes maduras e durante a germinação das sementes.

Com relação ao gene *Sdr4*, que codifica uma proteína com função desconhecida, verificou-se expressão deste gene na região do embrião em formação aos 14 dias após a antese (Figura 20). Ainda, o padrão de expressão deste gene mostrou relação direta com o caráter de dormência das sementes, pois nos ecótipos de arroz vermelho a expressão do gene foi superior em comparação às cultivares de arroz, onde a dormência das sementes é reduzida (Figura 20). A espécie silvestre *O. glaberrima* e a cultivar IRGA 417 apresentaram expressão quatro e cinco vezes, respectivamente, superior ao genótipo controle utilizado, a cultivar Kaybonnet. Estes valores foram bastante inferiores aos valores de expressão relativa apresentados pelos ecótipos de arroz vermelho AV 223 e AV 511, que apresentaram 72 e 84 vezes expressão superior a cultivar Kaybonnet.

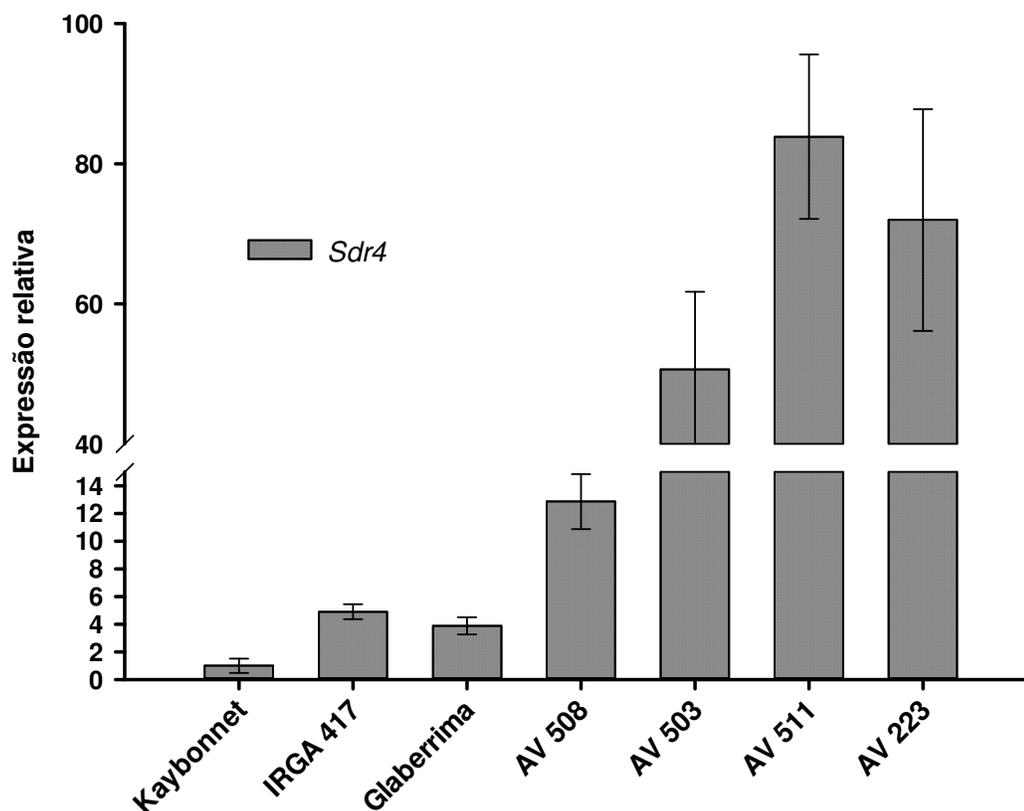


FIGURA 20. Expressão relativa do gene *Sdr4* na região do embrião em formação em sementes de genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

Quando o gene *Sdr4* foi analisado em sementes maduras, aos seis meses após a colheita, também foi possível verificar expressão do gene na região do embrião (Figura 21). A expressão deste gene pode estar relacionada com o caráter de dormência das sementes, já que a expressão relativa foi mais pronunciada nos genótipos com alta dormência (Figura 21). As cultivares IRGA 417, Kaybonnet e a espécie silvestre *O. glaberrima* apresentaram expressão relativa semelhante (Figura 21). Neste mesmo período, a germinação das sementes também foi avaliada, comprovando que de fato seis meses após a colheita, as sementes dos ecótipos AV 223 e AV 511 apresentam germinação inferior aos demais genótipos avaliados (Figura 13). Isto mostra, de forma indireta, que a dormência das sementes dos ecótipos AV 223 e AV 511 aos seis meses

após a colheita das sementes ainda é relacionada com os elevados níveis de expressão do gene *Sdr4* nestes ecótipos.

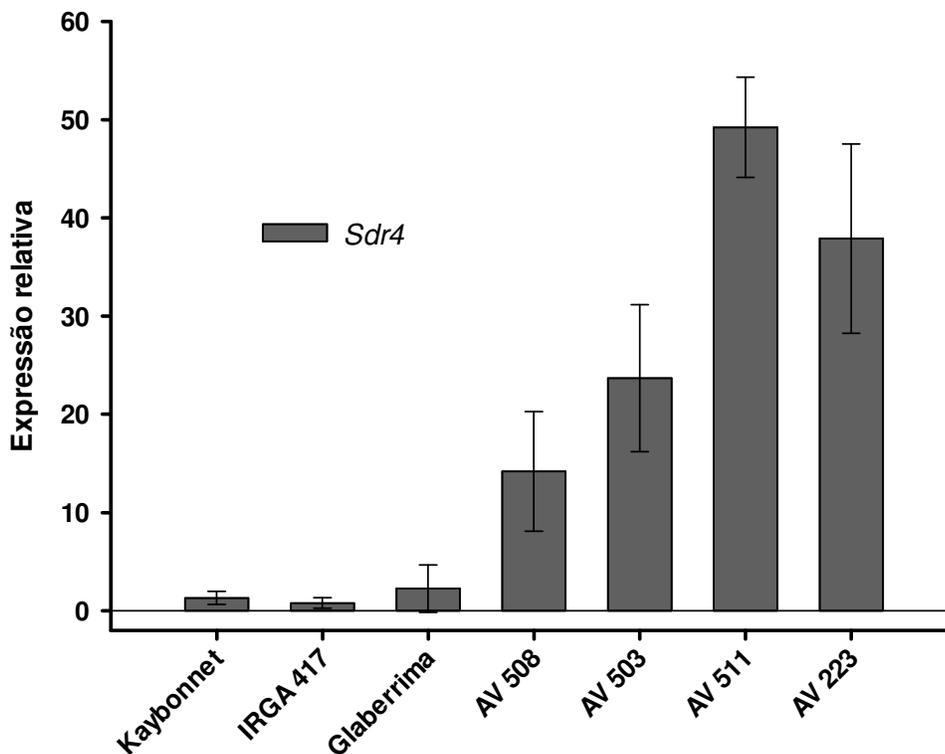


FIGURA 21. Expressão relativa do gene *Sdr4* na região do embrião em sementes maduras dos genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

Quando o gene *Sdr4* foi avaliado durante o processo de germinação das sementes houve expressão deste gene em todas as etapas avaliadas, às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação. Os níveis de expressão deste gene variaram entre os genótipos e conforme o momento da avaliação (Figura 22). Às 12 horas após exposição das sementes à germinação, todos os genótipos apresentavam suas sementes sem alterações visíveis (SA) (Figura 16). Neste momento o genótipo *O. glaberrima* apresentou o maior nível de expressão relativa do gene *Sdr4* (Figura 22A). Às 24 horas após expostas à germinação, os genótipos *O. glaberrima* e AV 223 mostraram os maiores níveis de expressão

relativa do gene *Sdr4* (Figura 22B). Às 36 horas a maior expressão relativa é mostrada pelo genótipo *O. glaberrima*, os demais ecótipos apresentam expressão inferior ou semelhante a cultivar Kaybonnet. Às 48 e 60 horas é possível verificar redução na magnitude da expressão do gene *Sdr4* nos genótipos avaliados, pois a nível de expressão relativa apresentado por todos os genótipos fica próximo ou inferior a cultivar Kaybonnet (Figura 22D e E). Cabe salientar que nas análises da expressão do gene *Sdr4* durante o período de formação do embrião (Figura 20) e embrião maduro (Figura 21) os maiores níveis de expressão do gene *Sdr4* foram observados nos ecótipos de arroz vermelho. Entretanto, isto não ocorreu nos resultados de análise de expressão do gene *Sdr4* durante a germinação às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação, quando não foi possível relacionar as diferenças nos níveis de expressão com ecótipos de arroz vermelho e cultivares de arroz. Este fato pode ser explicado, pois antes das sementes serem colocadas para germinar, para as análises às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação, as sementes tiveram a dormência superada e estavam aptas para germinar. O fato da cultivar IRGA 417 apresentar os menores níveis de expressão do gene *Sdr4* em todas as etapas avaliadas durante a germinação (Figura 22) e apresentar a maior velocidade de germinação (Figura 16), pode indicar que o gene *Sdr4* esteja de fato associado aos processos que reprimem a expressão de genes de germinação. Ainda se observada a magnitude de expressão do gene *Sdr4* durante o período de formação do embrião (Figura 20), embrião maduro (Figura 21) e durante as etapas de germinação (Figura 22), é possível verificar que a magnitude de expressão do gene em questão foi inferior quando as sementes possuíam dormência superada e foram expostas ao processo de germinação (Figura 22).

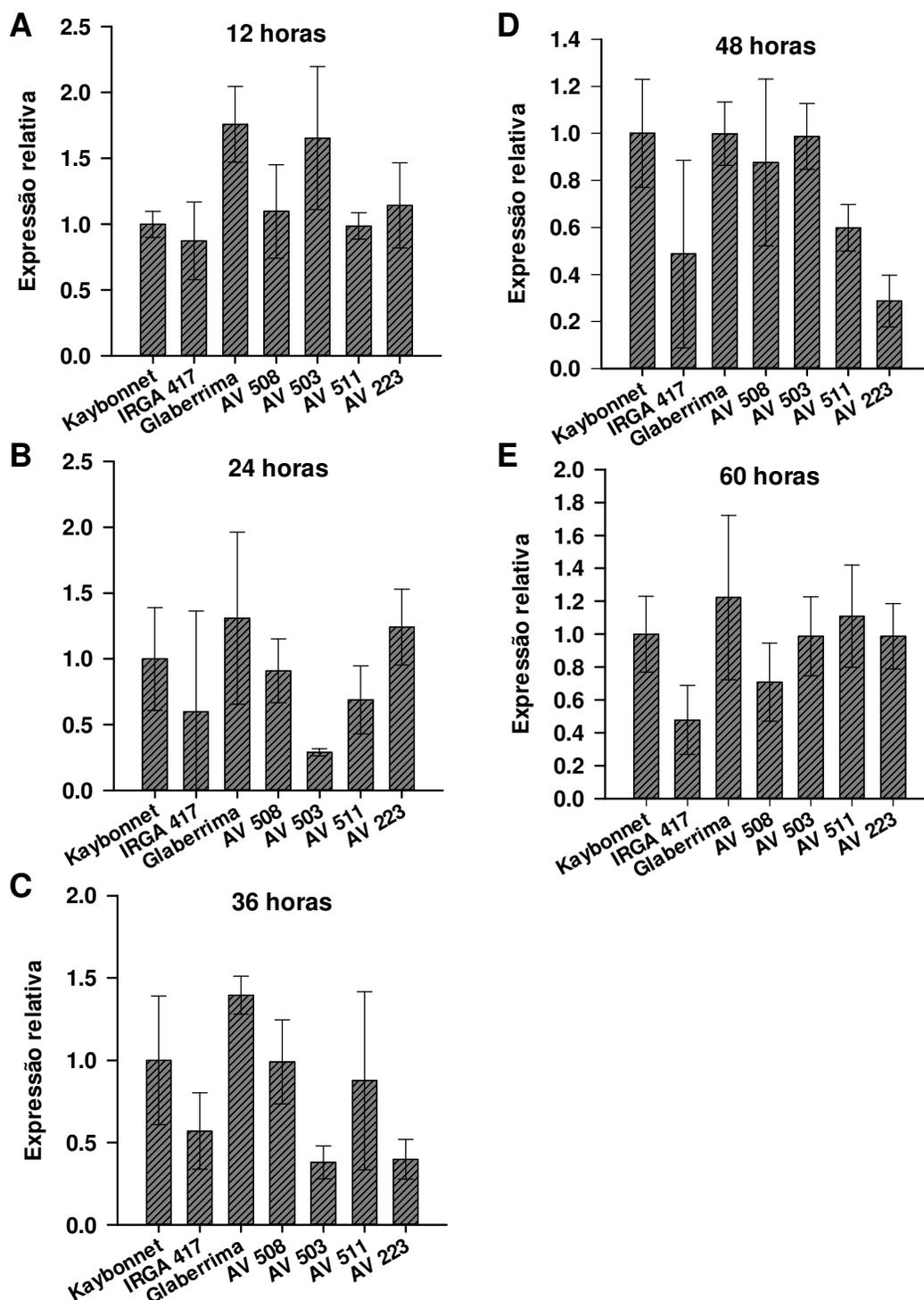


FIGURA 22. Expressão relativa do gene *Sdr4* em genótipos de arroz vermelho, cultivares de arroz e na espécie silvestre *O. glaberrima*, na região do embrião das sementes em processo de germinação, às 12 (A), 24 (B), 36 (C), 48 (D) e 60 (E) horas após expostas à germinação. Médias e desvio padrão apresentados. Porto Alegre, RS. 2013.

Os resultados apresentados acima apontam a relação do gene *Sdr4* com o caráter dormência, pois nas etapas fisiológicas avaliadas, a expressão do gene teve relação direta com o caráter em estudo. Mesmo que a sequência de aminoácidos formada pela tradução deste gene não mostre nenhuma semelhança com qualquer proteína conhecida, outros estudos também indicam a relação deste gene com o caráter de dormência das sementes (Sugimoto *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011b). O trabalho que desenvolveu uma linhagem isogênica de *Sdr4* utilizou um segmento de 7,5 Mb da cultivar Kasalath em um *background* de Nipponbare. Verificou-se que a taxa de germinação desta linhagem seis semanas após a colheita era de 2%, inferior inclusive a cultivar Kasalath que apresentou 4% de germinação e a taxa de germinação observada na cultivar Nipponbare foi de 58% (Sugimoto *et al.*, 2010). Neste estudo verificou-se que o alelo do gene encontrado em Kasalath (*Sdr4-k*) tem um efeito positivo na dormência das sementes. Ainda verificou-se que a cultivar Nipponbare possui apenas o alelo *Sdr4-n* e apresenta dormência reduzida. Já o grupo indica, que possui tanto o alelo *Sdr4-k* quanto o alelo *Sdr4-n*, apresenta dormência das sementes mais pronunciada (Sugimoto *et al.*, 2010). O mesmo trabalho observou alterações polimórficas nas sequências alélicas, o que poderia explicar a diferença funcional entre os alelos *Sdr4-n* e *Sdr4-k* (Sugimoto *et al.*, 2010). Ainda neste estudo, observaram-se dois mutantes *sdr4*, M101 e M125, que apresentaram ausência completa de dormência nas sementes, apresentaram 100% de suas sementes germinadas quatro semanas após a colheita. Quando avaliaram a expressão relativa do gene *Sdr4* nestes mutantes, observou-se que os mutantes M101 e M125 apresentava 2,3 e 2,0 vezes, respectivamente, expressão superior a cultivar Nipponbare (Sugimoto *et al.*, 2010).

Outra evidência da relação do gene *Sdr4* com o caráter de dormência foi relatada por Li *et al.* (2011b). Através de estudos de QTLs para este caráter verificaram que a região *qDGR7*, onde está localizado o gene *Sdr4*, apresenta forte influencia sobre o caráter de dormência (Li *et al.*, 2011). A expressão do *Sdr4* é regulada por *OsVP1*, que regula o potencial de dormência das sementes e reprime a expressão de genes de germinação (Sugimoto *et al.*, 2010). Assim, sugere-se que *Sdr4* atua como um regulador intermediário de dormência no programa de maturação das sementes (Sugimoto *et al.*, 2010). Isto explica o fato do gene *Sdr4* ter apresentado relação direta com o caráter de dormência nos genótipos testados, no presente estudo.

Na Tabela 11 é apresentado um resumo dos resultados relacionados com a expressão dos diferentes genes analisados no estudo da dormência de sementes em arroz vermelho. Os três genes analisados, *OsCYP707A5*, *OsMADS29* e *Sdr4*, foram avaliados conjuntamente, em etapas fisiológicas distintas da semente e desta forma, fica possível observar a relação da expressão de cada gene, como ausência de relação (0), relação positiva (+) e relação negativa (-) com o caráter de dormência das sementes.

Com relação ao período de formação do embrião, aos 14 dias após a antese, o gene *Sdr4* já havia sido registrado como tendo relação positiva com o caráter de dormência das sementes de arroz (Sugimoto *et al.*, 2010). Porém a expressão do gene *Sdr4* não havia sido registrada em arroz vermelho. No presente estudo, no período de formação do embrião, aos 14 dias após a antese, o padrão de expressão do gene *Sdr4* mostrou relação positiva com o caráter de dormência das sementes de arroz vermelho (Tabela 11). Neste mesmo momento, o presente estudo não verificou relação da expressão do gene *OsCYP707A5* com o caráter de dormência das sementes de arroz vermelho (Tabela 11). A

expressão do gene *OsMADS29* apresentou efeito negativo no caráter de dormência das sementes de arroz vermelho, aos 14 dias após a antese (Tabela 11).

TABELA 11. Relação da expressão dos gene avaliados, *OsCYP707A5*, *Sdr4* e *OsMADS29* com o caráter de dormência em momento distintos no desenvolvimento da semente. Porto Alegre, RS. 2013.

Momento da avaliação	Genes avaliados		
	<i>OsCYP707A5</i>	<i>OsMADS29</i>	<i>Sdr4</i>
	----- Relação com o caráter de dormência -----		
Semente em formação– Aos 14 dias após antese	0 ¹	+ ²	- ³
Sementes maduras – Aos seis meses após a colheita	0	+	-
Sementes em processos de germinação – Às 12, 24, 36, 48 e 60 horas após expostas à germinação	0	+	-

¹Ausência de relação com o caráter de dormência das sementes

²Relação positiva com o caráter de dormência das sementes

³Relação negativa com o caráter de dormência das sementes

No presente estudo os genes *OsCYP707A5*, *Sdr4* e *OsMADS29* foram testados no período das sementes maduras, aos seis meses após a colheita das mesmas. Neste momento fisiológico das sementes apenas o trabalho realizado por Liu *et al.* (2011) observou a expressão do gene *OsCYP707A5*, em sementes de arroz cultivado, e a expressão do gene foi relacionada a maior dormência das sementes. Não há estudos sobre a expressão dos genes *Sdr4* e *OsMADS29* em sementes maduras, aos seis meses após a colheita, nem mesmo em arroz cultivado. No presente estudo, o gene *OsCYP707A5* não apresentou relação com o caráter de dormência em sementes maduras de todos os genótipos de arroz testados. Na análise do gene *Sdr4* em sementes maduras, foi possível verificar que a expressão deste gene tem efeito positivo sobre o caráter dormência das sementes (Tabela 11). Já a expressão do gene *OsMADS29* neste mesmo momento apresentou novamente efeito contrário daquele observado para o gene

Sdr4, pois o gene *OsMADS29* apresentou maior expressão nos genótipos com menor nível de dormência, o que mostra efeito negativo sobre este caráter (Tabela 11). Desta forma, em sementes maduras o gene *Sdr4* apresentou efeito positivo ao caráter dormência das sementes de arroz vermelho, o gene *OsMADS29* apresentou efeito negativo, enquanto que o gene *OsCYP707A5* não possuiu relação com o caráter dormência nas sementes de arroz (Tabela 11).

Durante o processo de germinação das sementes os genes *Sdr4* e *OsMADS29* apresentaram expressão, o que não ocorreu com o gene *OsCYP707A5*, que não mostrou expressão durante esse processo. O trabalho que avaliou o nível de expressão em sementes de arroz durante a germinação das sementes foi realizado por Li *et al.* (2011a), no entanto com análises somente do gene *OsMADS29* em sementes de arroz cultivado. Neste mesmo trabalho, os maiores níveis de expressão do gene *OsMADS29* estavam relacionados com o surgimento da radícula nas sementes das cultivares (Li *et al.*, 2011a). No presente trabalho a expressão do gene *OsMADS29* mostrou que pode estar relacionada a determinadas etapas da germinação, que influenciam inclusive na velocidade deste processo. Estes resultados mostraram também a relação positiva do gene *OsMADS29* com o processo de germinação em sementes de arroz vermelho. Com relação ao gene *Sdr4*, verificou-se no presente estudo que este gene pode estar de fato associado aos processos que reprimem a expressão de genes de germinação, e que apresentam assim relação positiva com o caráter de dormência das sementes de arroz vermelho (Tabela 11). Desta forma, durante o processo de germinação das sementes o gene *OsCYP707A5* novamente não apresentou relação com o caráter de dormência nas sementes de arroz cultivado e daninho testadas. Ainda, a expressão do gene *OsMADS29* mostrou estar relacionada a determinadas etapas da germinação o que gera relação negativa

com o caráter de dormência das sementes, e o gene *Sdr4* mostrou mesmo relação positiva com o caráter de dormência das sementes de arroz vermelho, mesmo durante o processo de germinação das sementes.

5 CONCLUSÕES

Os ecótipos de arroz vermelho apresentam alto nível de degrane com pouca variabilidade entre os materiais avaliados. Entretanto, a variabilidade fenotípica do degrane aumenta quando é considerado a presença das cultivares de arroz.

Os genes *OsXTH8* e *OsCe19D* apresentam relação com a ativação e com a repressão desta característica em arroz vermelho, respectivamente. O gene *Sh4* apontado em alguns trabalhos como o principal gene responsável pelo caráter de degrane, não apresenta importância para o degrane no arroz vermelho oriundo da região do sul do Brasil.

A dormência das sementes possui maior intensidade no arroz vermelho quando comparado com as cultivares de arroz. Os ecótipos de arroz vermelho apresentam ainda grande variabilidade quanto aos níveis de dormência de suas sementes, mantendo viabilidade em tempo superior a 43 meses presentes no banco de sementes do solo. Esta variabilidade é reduzida nas sementes das cultivares de arroz analisadas, que 19 meses após sua deposição no solo já apresentam grande parte de suas sementes germinadas. A presença da casca da semente não tem influência na germinação das sementes tanto para as cultivares de arroz como para o arroz vermelho.

Os genes *OsCYP707A5*, *Sdr4* e *OsMADS29* analisados conjuntamente e em diferentes etapas fisiológicas da formação e germinação da semente apresentaram comportamentos distintos com relação a expressão gênica e dormência das sementes de arroz vermelho. Aos 14 dias após a antese, em sementes maduras, e em germinação os genes *OsCYP707A5*, *Sdr4* e *OsMADS29* apresentam, respectivamente, relação ausente, positiva, e negativa com o caráter dormência das sementes de arroz vermelho. Os resultados encontrados para arroz vermelho em relação aos descritos para arroz cultivado são diferentes para o gene *OsCYP707A5*, e são similares para os genes *Sdr4* e *OsMADS29*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, D. et al. Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 341-349, 2001.

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

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

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

ALI-RACHEDI, S. et al. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: Studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Nova Iorque, v. 219, n3, p. 479-488, 2004.

ALONSO-BLANCO, C. et al. Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, Baltimore, v. 164, n. 2, p. 711-729, 2003.

ANDRES, A.; MACHADO, S. L. O. Plantas daninhas em arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JUNIOR., A. M. (Ed.). Arroz irrigado no sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 457-546.

AMARAL, A. S.; GONÇALO, J. F. P. Dormência em sementes de arroz. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 30, n. 301, p. 35-37, 1977.

AVILA, L. A. D. et al. Banco de sementes de arroz vermelho em sistemas de semeadura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 773-777, 2000.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds**: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. San Diego: Academic Press, 1998. 666 p.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília: 1992. 365 p.

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

CHUNG, N. J.; PAEK, N. C. Photoblastism and ecophysiology of seed germination in weedy rice. **Weed Science**, Champaign, v. 95, n. 1, p. 184-190, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Consolidado e acompanhamento da safra de 2011/2012, 5º levantamento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 29 jul. 2012.

CUTLER, A. J. et al. Induction of (+)- abscisic acid 8' hydroxylase by (+)-abscisic acid in cultured maize cells. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 315, p.1787-1795, 1997.

DAVIS, A. S. et al. Environmental factors affecting seed persistence of annual weeds across the U.S. corn belt. **Weed Science**, Champaign, v. 53, n. 6, p. 868-869, 2005.

DAWSON, J. H.; BRUNS, V. F. Longevity of barnyardgrass, green foxtail, and yellow foxtail seeds in soil. **Weed Science**, Champaign, v. 23, n. 5, p. 437-440, 1975.

DELATORRE, C. A. Dormência em sementes de arroz vermelho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 565-571, 1999.

DELOUCHE, J. C. et al. **Weedy rices-origin, biology, ecology, and control.** Rome: FAO, 2007. 144p.

DOEBLEY, J. Unfallen grains: How ancient farmers turned weeds into crops. **Plant Science**, Clare, v. 312, n. 5778, p. 1318-1319, 2006.

DOI, K.; YASUI, H.; YOSHIMURA, A. Genetic variation in rice. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v. 11, n. 2, p. 144-148, 2008.

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

DONG, Y. J. et al. Identification of quantitative trait loci associated with pre-harvest sprouting resistance in rice (*Oryza sativa* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 81, n. 2-3, p. 133-139, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Oklahoma, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

DUSSAULT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, Waterloo, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2006.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. Culturas - Projeto Arroz. Melhoramento genético: Cultivares. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em: 10 julho. 2012.

FENG, Q. et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4. **Nature**, Londres, v. 420, n. 6913, p. 316-320, 2002.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, Malden, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.

FINKELSTEIN, R. et al. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 387-415, 2008.

FLECK, N. G. et al. Relative competitiveness among flooded rice cultivars and a red rice biotype. **Planta Daninha**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 101-111, 2008.

FOGLIATTO, S.; VIDOTTO, F.; FERRERO, A. Effects of winter flooding on weedy rice (*Oryza sativa* L.). **Crop Protection**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 1232-1240, 2010.

GEALY, D. R.; MITTEN, D. H.; RUTGER, J. N. Gene Flow Between Red Rice (*Oryza sativa*) and Herbicide-Resistant Rice (*O. sativa*): implications for Weed Management. **Weed Technology**, Lacombe, v. 17, n. 3, p. 627-645, 2003.

GOGGIN, D. E. et al. Initial characterisation of low and high seed dormancy populations of *Lolium rigidum* produced by repeated selection. **Plant Physiology**, Rockville, v. 167, n. 15, p. 1282-1288, 2010.

GOMES, A. S.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. M. **Arroz Irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 900 p.

GOULART, I. C. G. R. **Fluxo gênico e variação adaptativa de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) resistente aos herbicidas imidazolinonas**. 2011. 186 f. Dissertação (Mestrado em Herbologia) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GRAEBER, K. et al. Molecular mechanisms of seed dormancy. **Plant Cell Environment**, Hoboken, v. 35, n. 10, p. 1769-1786, 2012.

GRESSEL, J.; VALVERDE, B. E. A strategy to provide long-term control of weedy rice while mitigating herbicide resistance transgene flow, and its potential use for other crops with related weeds. **Pest Management Science**, Malden, v. 65, n. 7, p. 723-731, 2009.

GUBLER, F.; MILLAR, A. A.; JACOBSEN, J. V. Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v. 8, n. 2, p. 183-187, 2005.

GU, X. Y.; KIANIAN, S. F.; FOLEY, M. E. Dormancy genes from weedy rice respond divergently to seed development environments. **Genetics**, Baltimore, v. 172, n. 2, p. 1199-1211, 2006.

GU, X. Y. et al. The qSD12 underlying gene promotes abscisic acid accumulation in early developing seeds to induce primary dormancy in rice. **Plant Molecular Biology**, Waltham, v. 73, n. 1-2, p. 97-104, 2010.

GU, X. Y.; CHEN, Z. X.; FOLEY, M. E. Inheritance of seed dormancy in weedy rice. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 3, p. 835-843, 2003.

GUIMARÃES, I. F. G.; TILLMANN, M. A. A.; VILLELA, F. A. Métodos de superação de dormência para determinar o potencial germinativo de sementes de arroz. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 5, n. 1, p. 77-88, 2000. HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy- 1. primary dormancy. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 61-73, 1995.

HILHORST, H. W. M. The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 77-90, 1998.

HOAGLAND, R. E.; PAUL, R. N. Comparative study of red rice and several commercial rice (*Oryza sativa*) varieties. **Weed Science**. Champaign, v. 26, n. 6, p. 619-625, 1978.

HUANG, X. H. et al. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. **Nature Genetics**, Londres, v. 42, n. 11, p. 961-976, 2010.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Descriptors for rice *Oryza sativa* L.** Los Baños: Laguna, 1980. 21 p.

JACOBSEN, J. V. et al. Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. **Physiology Plant**, Rockville, v. 115, n. 3, p. 428-441, 2002.

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

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

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

- JIN, I. D. On the formation and development of abscission layer in rice plants, *Oryza sativa* L. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 55, n. 4, p. 451-457, 1986.
- KILIAN B. et al. Genetics and Genomics of the Triticeae. **Springer Science**, Nova lorque, p. 81-119, 2009.
- KOBAYASHI, A. Varietal adaptability for mechanized rice cultivation: direct seeding adaptability, shattering habit, smoothness. **Journal of Agricultural Science**, Ibaraki, v. 45, n. 4, p. 186-189, 1990.
- KONISHI, S. et al. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. **Science**, Washington, v. 312, n. 5778, p. 1392-1396, 2006.
- KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v. 5, n. 1, p. 33-36, 2002.
- KUSHIRO, T. et al. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8`-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. **The EMBO Journal**, Nova lorque, v. 23, n. 7, p. 1647-1656, 2004.
- LAWTON-RAUH, A.; BURGOS, N. Cultivated and weedy rice interactions and the domestication process. **Molecular Ecology**, Malden, v. 19, n. 16, p. 3243-3245, 2010.
- LEFEBVRE, V. et al. Functional analysis of *Arabidopsis* *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. **Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 309-319, 2006.
- LEOPOLD, A. C.; GLENISTER, R.; COHN, M. A. Relationship between water-content and afterripening in red rice. **Physiology Plant**, Rockville, v. 74, n. 4, p. 659-662, 1988.
- LI, C. B.; ZHOU, A. L.; SANG, T. Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. **New Phytologist**, Malden, v. 170, n. 1, p. 185-193, 2006a.
- LI, C. B.; ZHOU, A. L.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, Michigan, v. 311, n. 5769, p. 1936-1939, 2006b.
- LI, M. et al. Identification of quantitative trait loci associated with germination using chromosome segment substitution lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Nova lorque, v. 123, n. 3, p. 411-420, 2011a.
- LI, W. et al. Quantitative trait loci for seed dormancy in rice. **Euphytica**, Wageningen, v. 178, n. 3, p. 427-435, 2011b.
- LIN, S. Y.; SASAKI, T.; YANO, M. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Nova lorque, v. 96, n. 8, Jun, p. 997-1003, 1998.

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

LIU, F. et al. Sequence variation and expression analysis of seed dormancy- and germination-associated ABA- and GA-related genes in rice cultivars. **Frontiers Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 1-13, 2011.

MACHADO, S. L. D. et al. Core diameter and number of samples to estimative the red rice seed bank. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 459-461, 2010.

MANZ, B., K. et al. Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, n. 3, p. 1538-1551, 2005.

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

MENEZES N. L. et al. Dormência em sementes de arroz: causas e métodos de superação. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 7, n. 1, p. 35- 44, 2009.

MILLAR, A. A. et al. Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. **Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 942-954, 2006.

MIURA, K. et al. Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Nova lorque, v. 104, n. 6-7, p. 981-986, 2002.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 165-185, 2005.

NIKOLAEVA, M. G. Physiology of deep dormancy in seeds. **National Science Foundation**, Washington, v. 219, 1967.

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

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

NOLDIN, J. A.; CHANDLER, J. M.; MCCAULEY, G. N. Seed longevity of red rice ecotypes buried in soil. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 611-620, 2006.

NONOGAKI, H. Seed germination - The biochemical and molecular mechanisms. **Breeding Science**, Tokyo, v. 56, n. 2, p. 93-105, 2006.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p.10-13, 2004.

NUNES, A. L., **Variabilidade genética de características associadas ao degrane em arroz vermelho**. 2012. 128 f. Tese (Doutorado em Herbologia) - Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

OBA, S.; KIKUCHI, F.; MARUYAMA, K. Genetic-analysis of semidwarfness and grain shattering of chinese rice variety ai-jio-nan-te. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo v. 40, n. 1, p. 13-20, 1990.

OKAMOTO, M. et al. *CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 1, p. 97-107, 2006.

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

PANAUD, O. The molecular bases of cereal domestication and the history of rice. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 332, n. 2-3, p. 267-272, 2009.

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

PESKE, S.T. et al. Sobrevivência de sementes de arroz vermelho depositadas no solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 3, n. 1, p. 17-22, 1997.

PRATYUSH, D. D. et al. A new approach to touch down method using betaine as co-solvent for increased specificity and intensity of GC rich gene amplification. **Gene**, Amsterdam, v. 497, n. 2, p. 269-272, 2012.

QIN, Y. et al. Identification for quantitative trait loci controlling grain shattering in rice. **Genes & Genomics**, Nova Iorque, v. 32, n. 2, p. 173-180, 2010.

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

ROSE, J. K. C. et al. The XTH Family of Enzymes Involved in Xyloglucan Endotransglucosylation and Endohydrolysis: Current Perspectives and a New Unifying Nomenclature. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1421-1435, 2002.

SAS INSTITUTE INC. **Base SAS® 9.1**. Procedures Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SCHWANKE, A. M. L. et al. Morphological characterization of red rice (*Oryza sativa*) ecotypes derived from irrigated rice areas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 249-260, 2008.

SEO, M. et al. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 354-366, 2006.

SHIVRAIN, V. K. et al. Genetic diversity of weedy red rice (*Oryza sativa*) in Arkansas, USA. **Weed Research**, Malden, v. 50, n. 4, p. 289-302, 2010.

SESHU, D. V; DADLANI, M. Mechanism of seed dormancy in rice. **Seed Science Research**, Cambridge, v.1, n. 3, p.187-194, 1991.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado**: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Pelotas, 2010. 188 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado**: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Itajaí, 2012. 177 p.

SUGIMOTO, K. et al. Molecular cloning of Sdr4, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. **Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 13, p. 5792-5797, 2010.

TAKEUCHI, Y. et al. Fine linkage mapping enables dissection of closely linked quantitative trait loci for seed dormancy and heading in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Nova lorque, v. 107, n. 7, p. 1174-1180, 2003.

THOMSON, M. J. et al. Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. **Theoretical and Applied Genetics**, Nova lorque, v. 107, n. 3, p. 479-493, 2003.

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

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

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, S, p. W71-W74, 2007. Suplemento.

VIEIRA, H. D.; BARROS, R. S. Responses of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 1, p. 17-20, 1994.

WAN, J. M. et al. Genetic dissection of the seed dormancy trait in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, Clare, v. 170, n. 4, p. 786-792, 2006.

WELBAUM, G. E.; TISSAOUI, T.; BRADFORD, K. J. Water relations of seed development and germination in muskmelon.3. sensitivity of germination to water potential and abscisic-acid during development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 4, p. 1029-1037, 1990.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v. 5, n. 3, p. 218-223, 2002.

XIE, K. et al. Identification of QTLs for seed dormancy in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Breeding**, Malden, v. 130, n. 3, p. 328-332, 2011.

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

YANG, J. F.; GUO, Z. F. Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (*SgNCED1*) from *Stylosanthes guianensis* and its expression in response to abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, Nova lorque, v. 26, n. 8, p. 1383-1390, 2007.

YIN, L. L.; XUE, H. W. The *MADS29* Transcription factor regulates the degradation of the nucellus and the nucellar projection during rice seed development. **Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 3, p. 1049-1065, 2012.

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

ZHANG, Z. H. et al. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for seedling-vigour using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Field Crops Research**, v. 91, n.3, p. 161-170, 2004.

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

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

ZHU, Y. Q.; ELLSTRAND, N. C.; LU, B. R. Sequence polymorphisms in wild, weedy, and cultivated rice suggest seed-shattering locus *Sh4* played a minor role in Asian rice domestication. **Ecology & Evolution**, Londres, v. 2, n. 9, p. 2106-2113, 2012.

7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Análise de variância da resistência à tensão de ruptura (RTR) do grão no pecíolo no momento da maturação fisiológica das sementes de 17 genótipos de arroz. Porto Alegre, RS. 2013.

Avaliação fenotípica de grane

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Genótipo	16	11084,6447	111,92	<0,0001
Erro	51	99,0380		

APÊNDICE 2. Análises de variância da germinação a campo (A), germinação em condições ideais (B), avaliadas em 10 genótipos de arroz em três etapas distintas, ano 1 (2010), ano 2 (2011) e ano 3 (2012). Porto Alegre, RS. 2013.

Avaliação fenotípica dormência

A- Germinação a campo

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Ano	2	0,0384	0,06	<0,0001
Genótipo	9	2,5577	3,80	<0,0001
Ano*genótipo	18	2,6693	3,96	<0,0001
Erro	60			

Avaliação fenotípica dormência

B- Germinação em condições ideais

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Ano	2	0,0384	0,06	0,0008
Genótipo	9	2,5577	3,80	0,9446
Ano*genótipo	18	2,6693	3,96	<0,0001
Erro	60			

APÊNDICE 3. Análises de variância da dormência das sementes (A), sementes viáveis sem germinar (B) e sementes não viáveis (C), avaliadas em 10 genótipos de arroz em três etapas distintas, ano1 (2010), ano 2 (2011) e ano 3 (2012). Porto Alegre, RS. 2013.

Avaliação fenotípica dormência

A- Dormência das sementes

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Ano	2	156,9477	1155,72	<0,0001
Genótipo	9	45,7900	337,20	<0,0001
Ano*genótipo	18	5,7003	41,98	<0,0001
Erro	60			

Avaliação fenotípica dormência

B- Sementes viáveis sem germinar

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Ano	2	2,7055	31,76	<0,0001
Genótipo	9	1,7703	20,78	<0,0001
Ano*genótipo	18	0,8122	9,54	<0,0001
Erro	60			

Avaliação fenotípica dormência

C- Sementes não viáveis

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Ano	2	6,9864	21,04	<0,0001
Genótipo	9	13,3636	40,25	<0,0001
Ano*genótipo	18	2,7843	8,39	<0,0001
Erro	60			

APÊNDICE 4. Análise de variância da germinação de sementes de 10 genótipos de arroz avaliadas com e sem casca, seis meses após a colheita das sementes. Porto Alegre, RS. 2013.

Avaliação germinação com e sem casca

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Casca	1	519,4101	5,13	0,0291
Genótipo	9	3619,4900	36,35	<0,0001
Casca*genótipo	9	137,2610	1,38	0,2302
Erro	40			

APÊNDICE 5. Fragmento do gene *Sh4* (A) e conjunto de *primers* utilizados para amplificação do gene *Sh4* (B). Porto Alegre, RS. 2013.

A) Fragmento do gene *Sh4*

G = SNP procurado

CATAACGCGGGCTTTTAATAACGTATAGTGGCGGAGCTCAGCTCGCTGCGAGGTGGGCCACATAT
 CAGTGTGAGAGAACAGTAGTAAATGGTTTGGAGGGGAGGGGATGTAACAGCTACTATGAGTTTAAG
 TGTACGGTGC GCGCACCGACCATTACCGGAAACGGACGCCGGCGGCGGAGCCACGACCGCCGGAGG
 GAGCTGCAGCGACGACGGCGGCGGCTGAGGAGGAGGTGGGTGGTGGTATGGCCGTGATGGTGGTG
 CTGCTGCGCGGACGAGAGGCTTCGGCGGCGAGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGAGCACC
 GGTGGTGGCGGCGGGTGGGCGGATCGTGGCGCCGCCGCGTTCGCGCCGCGGCGGCGGAGAGCACC
 TCGGAGAGCGCGTCTAGACTCCGGCGCCAGGTTGGTGGGGAGGTTGCAGTCTTTCGCTCGTGCC
 GCTCCATCGTCCAGTACGACGGGAGGGGGCGGAGTTGGCGGCGGCCGCGCCGCGGTTGGCGGCGG
 CGGCGGCGACGCGGGACTCGTAGTCGCGGACTTCTTGTAG**TCGCGGAGGAGGTTGTCCCACTTGTC**
AT**TGCACTGGTTCTGGCTGCGG**AGGC**AGCCGTTCTTCCAGCAGTAG**TCTCCACCCACTTCCACCG
 CTGCTCCGCCGACCTCGGCGTTCGGCGGCGACCCGGCGCCGCCGACCCAGCCGCGGCCCCCAACG
 CCGGCGCGGCGGTCTGCTCCAGACGATTGGCGGTGATGAGGATGAGC**G**TCTCGTGCAGCGTCCAG
 TTCCCCTTGCGGTAGTCCCGCGGCGCCGACCCCGACGCCGGCGACGGCGGCGGCGCGCCGCCCCG
 TCGCCCCGACGCGGCGGTAGCAGTCAGGTGCCCGTGGCCGTGGCCGTGCGCGCGGAGCAGCGCGA
 GCGGCGAGACCGCCGCCCGCGGTCGAGGCGGATGGCGAGGG**TCGGCAGAGGAGCCCGACAT**GC
 TGCTCGCTCGCGCGCGCGGCGCGGTCGTGTGTCGCGGGCGTAGCGACTGGCG**AGAGCCAAGGC**
AAGCTGAG**GCGTTTGGTGT**TCGGGAGCGATGCGCGTTCGGCGTTCGCCGATTTACAAGGCCGCAC
 GCGTTGTGTTTTGCG

B) Sequências dos *primers* utilizados para sequenciamento do gene *Sh4*, com cores indicando sua localização na região do exon um do gene *Sh4*.

Nome	Combinação <i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	Fragmento esperado (pb)
<i>Sh4</i> <i>Pair A</i>	Primer A_F Primer A_R	TCGCGGAGGAGGTTGTCCCA ATGTCCGGGCTCCTCTGCCGA	422
<i>Sh4</i> <i>Pair B</i>	Primer B_F Primer A_R	TGCACTGGTTCTGGCTGCGG ATGTCCGGGCTCCTCTGCCGA	394
<i>Sh4</i> <i>Pair C</i>	Primer C_F Primer C_R	AGCCGTTCTTCCAGCAGTAG CTCAGCTTGCCTTGGCTCT	447
<i>Sh4</i> <i>Pair D</i>	Primer C_F Primer D_R	AGCCGTTCTTCCAGCAGTAG ACACCAAACGCCTCAGCTT	458
<i>Sh4</i> <i>Pair E</i>	Primer E_F Primer D_R	CCACTTGTCATTGCACTGGT ACACCAAACGCCTCAGCTT	493
<i>Sh4</i> <i>Pair F</i>	Primer E_F Primer A_R	CCACTTGTCATTGCACTGGT ATGTCCGGGCTCCTCTGCCGA	403
<i>Sh4</i> <i>Pair G</i>	Primer G_F Primer A_R	GCCGTTCTTCCAGCAGTAGT ATGTCCGGGCTCCTCTGCCGA	367

8 VITA

Catarine Markus é filha de Vilmar Markus e Bernadeth Markus. Nasceu em Taquari/RS, em 21 de fevereiro de 1988. Em 2004, completou o Curso Técnico em Administração de Empresas no Instituto Genecista General Canabarro (IECEG), na cidade de Teutônia/RS. No ano de 2005 completou o ensino médio no IECEG. Em 2006, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), onde graduou Engenheira Agrônoma em 2010. De 2007 a 2010, foi bolsista de Iniciação Científica (IC) na área de Herbologia sob orientação do Prof. Dr. Dirceu Agostinetto. Em 2008, também foi bolsista voluntária por um ano na EMBRAPA Clima Temperado, na cidade de Pelotas/RS. Neste período esteve sob orientação da Pesquisadora Lilian Terezinha Winckler Sosinski. Em 2010, realizou o estágio curricular obrigatório na Texas A&M University – AgriLive Research & Extension, na cidade de College Station/EUA, sob orientação do PhD Scott Senseman, na área de comportamento e dinâmica de herbicidas no solo. No período como bolsista de IC teve bolsa de estudos financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em 2011, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS, em Porto Alegre/RS, também com apoio financeiro do CNPq.