

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

TESE

Caracterização Molecular (RAPD) e
Análise das Proteínas de Reserva em Grãos de
Variedades Locais de Arroz do Maranhão

Elisangela Sousa de Araújo

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA –
CIÊNCIA DO SOLO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR (RAPD) E
ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE RESERVA EM GRÃOS DE
VARIEDADES LOCAIS DE ARROZ DO MARANHÃO**

ELISANGELA SOUSA DE ARAÚJO

Sob a Orientação do Professor
Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2006

633.18 Araujo, Elisangela Sousa de, 1975-

A633c

T

Caracterização molecular (RAPD) e análise das proteínas de reserva em grãos de variedades locais de arroz do Maranhão / Elisangela Sousa de Araújo. - 2014.

56 f.: il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 51-56

1. Arroz – Cultivo - Teses. 2. Arroz – Variedades - Teses. 3. Arroz – Maranhão - Teses. 4. Genética agrícola- Teses.

1. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939 -. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

ELISANGELA SOUSA DE ARAÚJO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 23/02/2006

Manlio Silvestre Fernandes. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Sonia Regina de Sousa. Dr^a. UFRRJ

Norma Gouvêa Rumjanek. Ph.D. Embrapa Agrobiologia

José Ronaldo Magalhães. Dr. Embrapa Gado de Leite

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia

Ao grande Deus da minha vida, sempre presente e provedor de tudo, eis em tuas mãos a minha simples oferta, pois somente tu és digno de toda glória, toda honra e o louvor.

Aos meus pais que depositaram em mim os seus sonhos de estudar,
À razão do meu viver e de toda alegria e força que tenho adquirido desde a sua concepção,
Minha filha Ana Luiza,

A vocês Ofereço e Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao meu MESTRE, meu querido e admirável professor Manlio pela orientação, apoio, ensinamentos e confiança depositados em mim além de referência como pesquisador;

Minha professora e co-orientadora Sonia Regina e brilhante pesquisadora, por todos os momentos convvidos;

Aos professores Alex (MA), Edna e Eliane (RJ) pela ajuda financeira durante **o tempo** em que fiquei sem bolsa além do carinho e ensinamentos;

Ao corpo docente do CPGA-CS pela paciência e ensinamentos e Embrapa Agrobiologia;

Ao professor Barbara, pelos estímulos e ensinamentos;

ACAPES pela bolsa concedida no segundo ano,

À FAPERJ pela bolsa concedida nos dois últimos anos e financiamentos dos projetos;

Meus queridos “assistentes” de laboratório Alexandra, Aline e Diogo;

A TODOS do Laboratório de nutrição de plantas e Marian Lis pelas sugestões;

A coordenação do CPGA-CS, e inevitavelmente não poderia deixar de citar o Roberto e a Luciene, sempre prestativos e carinhosos, meu muuuito obrigado!!!!!!

Ao companheiro Zé Dias que durante os meus seis meses de gravidez me conduzia **todos** os dias do laboratório para o Alojamento e a Waleska por me acompanharnas consultas do meu pré-natal e pela amizade adquirida;

A Igreja Presbiteriana da Rural pelos cuidados e carinhos prestados a mim.

Minha amiga e irmanzona Mariella, pelas conversas, apoio, *cuidados*, companheirismo, concedidos somente a uma verdadeira amiga;

Minha amada família: pais, irmãos, sobrinhos, cunhados e Dona Dodô.

As “amigas” do alojamento;

Por trás desse trabalho existem ainda tantas pessoas que só de lembrar me emociona e comove por tanta ajuda e carinho recebidos até aqui, por isso a TODOS vocês que fizeram e fazem parte dessa estória meus SINCEROS AGRADECIMENTOS.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da extração do DNA da metade do embrião a partir da semente.	17
Figura 2. Esquema ilustrando a metodologia utilizada para extração sequencial de proteína de reserva em arroz.....	23
Figura 3. Comparação entre as soluções de 0,25 e 0,4% NaOH para extrações de Glutelina em variedades de arroz do Maranhão. *Letras Maiúsculas não diferem significativamente entre os tratamentos e minúsculas não diferem estatisticamente entre genótipos pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).	24
Figura 4. Eletroforese SDS-PAGE das frações proteicas: albumina+gobulina, prolamina e glutelina da IR-8 e M-marcador.	25
Figura 5 Relação entre da média do teor de PB e razão C/L no grão de arroz em 17 variedades de arroz.	29
Figura 6. Temperaturas diárias no interior da casa de vegetação, durante o período experimental. Setas para cima indicam a época do Experimento I e setas para baixo, o Experimento II.	29
Figura 7. Correlação entre teor de prolamina e relação comprimento /largura no grão de arroz em 17 variedades locais de arroz do Maranhão.	33
Figura 8. Relação entre percentagem de Proteína Bruta e Teor de glutelina (mg/g de farinha) no grão de arroz em 17 variedades locais de arroz do Maranhão.....	35
Figura 9. Extração de DNA com duas amostras em sete repetições. a) DNA extraído, b) DNA tratado com RNase.....	35
Figura 10. RAPD utilizando o primer OPA-04 com 20 variedades de arroz e milho (teste). A letra M representa o marcador $\emptyset 174$	36
Figura 11. Amplificação de DNA de algumas variedades de arroz com o primer OPA 02. a) DNA extraído do embrião de arroz e b) DNA extraído de folha de arroz.....	36
Figura 12. Dendrograma de similaridade genética a partir dos produtos amplificados do DNA por RAPD de 20 acessos locais de arroz do Maranhão.	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Variedades locais de arroz do Estado do Maranhão.	18
Tabela 2. Análise de variância para efeito de genótipo de arroz e de concentração de 0,25 e 0,4% e Testemunha sobre a extração da glutelina (mg de farinha/mg proteína) realizados no período de Novembro de 2002 a junho de 2003. Seropédica, UFRRJ, 2006.	24
Tabela 3. Medidas das sementes de 20 acessos de arroz: C-comprimento, E-espessura, L-largura e C/L- relação comprimento/largura e forma do grão.	26
Tabela 4. Análise de variância para efeito de genótipo de arroz e de temperatura sobre a extração da proteína bruta (PB) realizados no período de Experimento I Ago/2002 e Experimento II Nov/2002 em 17 variedades de arroz.	27
Tabela 5. Proteína Bruta (%PB): efeito do genótipo e Experimento I, no período de Ago-2002 a Mar-2003 e Experimento II Nov-2002 Jun-2003 nas 17 variedades de arroz. Seropédica, UFRRJ, 2006.	28
Tabela 6. Análise de variância das frações das proteínas de reserva: Albumina + Globulina, Prolamina e Glutelina. Efeito do genótipo e Experimento I (Ago-2002) e Experimento II (Nov-2002) nas 17 variedades de arroz.	30
Tabela 7. Albumina e Globulina: efeito do genótipo e Experimento I, no período de Ago-2002 a Mar-2003 e Experimento II Nov-2002 Jun-2003 nas 17 variedades de arroz. Seropédica, UFRRJ, 2006.	31
Tabela 8. Prolamina: efeito do genótipo e Experimento I, no período de Ago-2002 a Mar-2003 e Experimento II Nov-2002 Jun-2003 nas 17 variedades de arroz. Seropédica, UFRRJ, 2006.	32
Tabela 9. Glutelina: efeito do genótipo e Experimento I, no período de Ago-2002 a Mar-2003 e Experimento II Nov-2002 Jun-2003 nas 17 variedades de arroz. Seropédica, UFRRJ, 2006.	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Proteínas do Grão de Arroz	3
2.1.1. Albumina e globulina	4
2.1.2. Prolaminas	4
2.1.3. Glutelina	5
2.2. Extração das Proteínas de Reserva	6
2.2.1. Métodos cromatográficos	6
2.2.2. SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	7
2.3. Caracterização das Frações das Proteínas de Reserva.....	7
2.4. Correlação entre Qualidade Nutricional x Fenótipo no Grão de Arroz.....	8
2.5. Estudo da Diversidade Genética em Plantas.....	8
2.5.1. Variabilidade genética detectada a partir de análise fenotípica.....	9
2.5.2 Construção de mapas genéticos.....	10
2.6. Taxonomia Vegetal a partir de Caracteres Morfológicos	10
2.7. Marcadores Moleculares na Conservação de Germoplasma Vegetal.....	11
2.8. Marcadores Moleculares Utilizados na Identificação de Cultivares.....	12
2.8.1. RAPD	12
2.8.2. Microsatélites-SSR	14
2.9. Detecção de Polimorfismo Vegetal a partir de DNA Extraído da Semente	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Análise de Proteína Bruta (PB) no Grão.....	18
3.2. Extração das Frações Protéicas.....	19
3.3. Extração Sequencial das Frações Protéicas	19
3.3.1. Albumina + globulina.....	19
3.3.2. Prolamina.....	19
3.3.3. Glutelina	19
3.4. Determinação do Teor das Proteínas	19
3.5. Diversidade Genética em Variedades de Arroz através da Técnica de RAPD.....	20
3.5.1. Extração de DNA vegetal.....	20
3.5.2. Verificação da extração do DNA e quantificação	21
3.5.3. Técnica de RAPD	21
3.5.4. Análise filogenética	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Otimização da Técnica de Extração de Proteína de Reserva.....	22
4.2. Forma do Grão.....	26
4.3. Proteína Bruta (%PB).....	27
4.4. Extração Sequencial das Proteínas de Reserva.....	30
4.4.1. Albumina + globulina.....	30
4.4.2. Prolamina.....	31
4.4.3. Glutelina	33
4.5. Caracterização Molecular em Grãos Utilizando RAPD	35

4.5.1. Construção do dendrograma.....	36
5. CONCLUSÕES	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

ARAÚJO, Elisangela Sousa. **Caracterização molecular (RAPD) e análise das proteínas de reserva em grãos de variedades locais de arroz do Maranhão.** 2006. 44f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo com potencial ainda subestimado o que torna fundamental a caracterização do material genético local. Os recursos genéticos são estudados em várias etapas e identificar características de valor agrônomo em variedades rústicas é um dos papéis dos bancos de germoplasma (BAG's). Em arroz, por se tratar de uma cultura muito relevante para a dieta da população brasileira, selecionar genótipos com alta produtividade, valor nutricional e adaptados às mais diversificadas condições ambientais é uma busca contínua em programas de melhoramento. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivos adaptar metodologias para extração de proteína de reserva e de DNA de sementes de arroz a fim de serem empregadas na rotina de laboratório para caracterização de bancos de germoplasma. Após otimização das metodologias, sementes de vinte variedades locais de arroz do Estado do Maranhão cultivadas em épocas distintas (Experimento I: Ago-2002 a Mar-2003 e Experimento II: Nov-2002 Jun-2003) foram analisadas para fins de estudo de diversidade genética (DNA e proteína) e efeito da sazonalidade em seu acúmulo de proteína bruta e reserva. A análise de variância para teor de proteína e frações proteicas foi altamente significativa ($P < 0,01$) entre os genótipos, e os experimentos. As médias das frações proteicas albumina+globulina e glutelina foram superiores no experimento I, cujas temperaturas médias foram de 33°C enquanto que a média da proteína bruta (PB) foi superior no Experimento II em que a média de temperatura foi de 41°C. Das variedades analisadas, a Pingo d'água (220019) e Jatobá (220012) foram as que apresentaram os maiores valores para PB (11,32 e 11,13%) e glutelina (83,73 e 92,86 mg.g farinha). A caracterização molecular pela RAPD foi baseada em 37 bandas polimórficas e a análise filogenética revelou uma diversidade genética em 50% com formação de quatro grupos e três variedades isoladas. Os grupos formados pelas variedades de nome Lageado e Zebu branco parecem ter sido pela forma dos grãos e razão C/L.

Palavras chave: Extração de DNA. Extração de proteínas. Marcadores moleculares.

ABSTRACT

ARAÚJO, Elisângela Sousa. **Molecular characterization (SSR and RAPD) and analysis of storage proteins in grains of local varieties of rice of the Maranhão.** 2006. 44f. Thesis (Philosophiæ Doctor in Agronomy - Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Brazil is the country with the greatest plant genetic diversity in the world with the potential still underestimated what makes it necessary to characterize local genetic material. Genetic resources are studied in several stages and identify traits of agronomic value in hardy varieties is one of the roles of gene banks (BAG's). In rice, because it is a very important crop for the diet of the Brazilian population, selecting genotypes with high yield, nutritional value and adapted to the most diverse environmental conditions is a continuous search for improvement programs. In this sense, the present study aimed to adapt methodologies for protein extraction reserve and DNA of rice seeds to be used in routine laboratory for characterization of germplasm banks. After optimization of methodologies, seeds of twenty local varieties of rice grown in the state of Maranhão different times (Experiment I: Aug-2002 to Mar-2003 and Experiment II: Nov-2002 to Jun-2003) were analyzed for study of diversity genetic (DNA and protein) and seasonality effect on its accumulation of reserves and gross protein. The analysis of variance of protein content and protein fractions was highly significant ($P < 0.01$) between genotypes and experiments. The mean protein fractions albumin+globulin and glutelin were higher in experiment I, whose average temperatures were 33°C while the average gross protein (CP) was higher than in Experiment II in which the average temperature was 41°C . Varieties analyzed, the Pingo d' água (220019) and Jatobá (220012) showed the highest values for PB (11.32 and 11.13%) and glutelin (83.73 and 92.86 mg flour). The molecular characterization by RAPD was based on 37 polymorphic bands and phylogenetic analysis revealed a genetic diversity at 50% training with four groups and three separate varieties. Groups based on the varieties named Lageado and Zebu branco seem to have been the shape of the grains and reason C/L.

Key words: DNA extraction. Protein extraction. Molecular markers.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do arroz é certamente uma das mais antigas e conhecidas em todo o mundo, pois é dotada de ampla adaptabilidade das baixas às mais elevadas temperaturas e aos mais variados climas, portanto, cultivada em praticamente todos os continentes. Ao chegar ao Brasil, por volta de 1700, adaptou-se ao nosso clima com muita facilidade e rapidez o que acabou nos tornando não só um grande consumidor, mas também produtor de arroz.

Isso pode ser comprovado quando observamos os dados da safra de 2004/05 em que o Brasil produziu cerca de 13.273 milhões de toneladas, o que corresponde a 3% e 27% a mais quando comparado às safras de 2002/03 e 2000/01, respectivamente. Este crescimento nacional é observado em todas as regiões brasileiras e o estado do Maranhão, que tem a sua participação na história do arroz no país, está ocupando o 4º lugar com uma safra de 718 mil toneladas, seus antecessores são os estados de Santa Catarina (3º) com 1.049 milhões de toneladas, Mato Grosso (2º) com 2.043 milhões de toneladas, e Rio Grande do Sul (1º) com 6.205 milhões de toneladas. Esses dados contribuem para as exportações brasileiras, pois o atual cenário internacional de arroz apresenta um déficit de 38,5 milhões de toneladas (CONAB, 2006).

Dentro desse contexto, o Brasil tornou-se o maior produtor de arroz do ocidente, sendo o 9º colocado na safra mundial de 2004/05. No entanto, sua produção é 14 vezes menor que o 1º colocado, a China, com aproximadamente 186 milhões de toneladas, que possui cerca de 30% do volume total de arroz produzido no planeta (CONAB, 2006).

Quanto à área plantada, o país cujo índice mais elevado, com 42,50 milhões de hectares é a Índia, que responde por 27,7% da área arroseira do planeta. Já, no cenário brasileiro, a área plantada da safra de 2004/05 foi de 3.916 milhões de hectares, tendo um pequeno acréscimo nos últimos 10 anos devido a uma expansão na área em 730 mil hectares. O estado do Rio Grande do Sul possui a maior área do país, com 1.049 milhões de hectares, em segundo o estado de Mato Grosso com 776,9 mil hectares e em terceiro o estado do Maranhão com 537,8 mil hectares. Desses estados, o que apresentou um maior crescimento foi o Mato Grosso que comparado à safra de 2002 apresentou um acréscimo de 331,00 mil hectares, enquanto o Rio Grande do Sul e o Maranhão apenas 89 e 38 hectares, respectivamente (CONAB, 2006).

Esse aumento na safra de 2004/05 pode também ter contribuição do aumento da produtividade das variedades usadas no cultivo do arroz, que saltou de 2.362 (1990) para 3.377 kg ha⁻¹ (2004/05). De fato, isso é observado para as maiorias das regiões do Brasil, das quais podemos destacar a região Sul, que na década de 90 já utilizava variedades com produtividade de 4.417 kg ha⁻¹ sendo que no ano passado atingiu uma média de 5.847 kg ha⁻¹. Ainda na região Sul, vale destacar o estado de Santa Catarina que apresentou a maior produtividade de arroz no Brasil com uma média de 6.800 kg ha⁻¹ na safra de 2004/05. Já, o Estado do Maranhão, detentor da quarta maior safra, terceira maior área plantada do país, infelizmente é o 22º colocado em produtividade, demonstrando uma realidade ainda distante da observada para os estados da região Sul e estado do Mato Grosso (CONAB, 2006).

Mesmo com a biotecnologia propiciando o lançamento de novas variedades e lançamento de híbridos altamente produtivos, melhorias das técnicas na condução das lavouras e maior eficiência dos insumos utilizados, estes, ainda não fazem parte da realidade da maioria dos produtores do Maranhão, que é caracterizada pelo uso de variedades rústicas e ausência de tecnologia no sistema de cultivo específica para suas condições edafoclimáticas.

Por isso, os estudos sobre a variabilidade genética de variedades locais utilizando técnicas oriundas da tecnologia do DNA recombinante como a Reação em Cadeia da Polimerase- PCR é de suma importância, e para isso, a origem do DNA da planta utilizado nessas análises também deve ser considerada. O método de extração de DNA e a parte do

tecido vegetal amostrado sejam a partir de tecido das folhas, raízes ou sementes já é bem utilizado em análises de caracterização molecular, o DNA extraído do tecido do embrião, por exemplo, além de diminuir o tempo, dispensando a germinação; pode ser utilizado em marcadores moleculares para análise de diversidade genética.

Após a caracterização molecular, certamente, o melhoramento de variedades específicas para cultivo em condições desfavoráveis se faz necessário não só para o incremento da produtividade, mas também, para minimizar os custos com insumos nitrogenados, aplicação de agroquímicos e aumento na qualidade nutricional.

A qualidade nutricional dos grãos é determinada pelos seus principais constituintes: carboidratos, lipídeos e proteínas. As proteínas de reserva correspondem a mais de 50% do total das proteínas nos grãos de cereais, tendo, portanto, importância a sua qualidade nutricional tanto para o homem como animal. Comparados às leguminosas os grãos de cereais contêm menos proteína, no entanto, a quantidade de proteína consumida é cerca de três vezes superior à derivada de sementes de leguminosas. Ou seja, apesar dos cereais possuírem um baixo teor de proteína nos grãos, limitando a sua qualidade nutricional, constitui-se em uma das principais fontes protéicas de baixo custo, de extrema importância para alimentação humana de menor poder aquisitivo. Entre os cereais, o arroz é um dos que apresentam menor teor proteico, no entanto, possui a proteína de melhor qualidade em seus grãos, que é a glutelina, e quando o arroz é combinado com leguminosas, como o feijão na dieta, torna-se um alimento ainda mais valioso.

Estudar a proteína bruta e suas frações protéicas em grãos de arroz é importante para o direcionamento e enriquecimento da base genética em programas de melhoramento, principalmente para a adição de características que contribuam para o incremento no valor nutritivo da cultura. No entanto, extrair proteínas de reserva requer tempo e é uma técnica laboriosa, limitando dessa forma o seu emprego em larga escala. Por isso, a busca por métodos mais simples e rápidos tem se intensificado visando uma automação para o trabalho com maior número de amostras possíveis.

Em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa de nutrição mineral de plantas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro com variedades locais de arroz do estado do Maranhão, observou-se elevado teor de Proteína Bruta (PB) para algumas variedades, mesmo quando cultivadas em solos pobres em nutrientes e sem adição de insumo. Também foi verificada uma correlação negativa entre o acúmulo de PB em variedades que apresentaram uma menor relação comprimento/largura no grão (ARAÚJO, 2002).

A seleção de variedades para o melhoramento, tomando como base às características de produção, resistência e qualidade nutricional adaptadas à sua região tradicional de cultivo, certamente são medidas que propiciarão uma contribuição inestimável para a agricultura no país. Diante desse contexto, o presente trabalho, teve por objetivos:

- Determinar a proteína bruta em 20 variedades locais do estado do MA cultivadas em duas épocas distintas no Rio de Janeiro,
- Verificar a existência de correlações entre as formas dos grãos e a distribuição das suas frações protéicas.
- Aperfeiçoar técnicas para extração de DNA e proteínas de reserva em grãos de arroz para uso em larga escala.
- Verificar a similaridade genética entre 20 variedades locais do estado do MA através das técnicas de RAPD utilizando DNA extraído de parte do tecido do embrião da semente;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteínas do Grão de Arroz

As proteínas dos cereais correspondem a mais da metade da produção de proteína total do mundo (LÁSZTITY, 1986). Na Ásia, aproximadamente 80% da população alimenta-se basicamente de arroz (FURUKAIN et al. 2003 e YOKOYAMA et al., 1999). Ao contrário de outros cereais como o trigo e o centeio, o arroz é consumido na forma de grãos.

As proteínas de reserva do arroz são classificadas como proteínas do endosperma (prolaminas e glutelinas), mas existe a contribuição de outras proteínas como a globulina e albumina, que são metabolicamente ativas e participam na formação de proteínas das membranas, ribossomos e regulatórios de outras proteínas (LÁSZTITY, 1986).

As proteínas são inicialmente sintetizadas na membrana do retículo endoplasmático (ER) e são translocados para o RE lúmen, elas são estocadas em corpos protéicos distintos. As prolaminas são estocadas como grânulos (PB I) enquanto as glutelinas são compactadas no compartimento vacuolar de proteínas de reserva (PB II). Estes corpos protéicos são diferenciados em nível de microscópio eletrônico. As prolaminas contidas no PB I são esféricas, com diâmetro cerca de 1-2 μ m e as glutelinas contidas no PB II são maiores 3-4 μ m e de forma irregular (TAKEMOTO et al., 2002). As proteínas PB-I constituem 20-30% e a PB II cerca de 70-80% do total de proteína bruta encontrada no grão (FURUKAWA, 2003).

No entanto, o processo responsável pela formação dos corpos protéicos ainda é pouco conhecido e muito menos se sabe sobre os genes que regulam seus processos celulares e bioquímicos.

As proteínas de reserva são particularmente importantes não somente pelo seu teor total, mas também pela sua qualidade. Por exemplo, o baixo teor dos aminoácidos lisina, treonina e triptofano em vários cereais e de cisteína e metionina nas leguminosas é devido às suas baixas proporções contidas nas principais proteínas de reserva o que acaba limitando seu valor nutricional.

As frações das proteínas de reserva possuem uma mistura de componentes que exibem polimorfismo entre genótipos da mesma espécie. Esses polimorfismos aparecem na presença de famílias multigênicas e, em alguns casos, em processos de glicosilação e proteolíticos (SHEWRY et al., 1995).

A qualidade nutricional dos grãos é determinada principalmente pelo teor de proteína bruta (PB) (DECKARD et al., 1994). Pois, o aumento da PB é acompanhado pelo aumento da glutelina, que é a proteína determinante na qualidade nutricional do grão. A combinação de altas produções e altos teores de PB dos grãos pode ser alcançada com o uso de variedades eficientes no uso de N disponível (SHERRARD et al., 1984). Dentre os fatores ambientais que interferem no teor da PB, são citados: intensidade de luz, temperatura do ar e disponibilidade de água (TROBOIS et al., 2001; CAGAMPANG et al., 1966). No entanto, poucos estudos têm sido realizados com relação aos efeitos ambientais e suas interações no acúmulo das frações protéicas durante o enchimento do grão. (TRIBOI et al, 2002).

A extração sequencial das proteínas dos cereais pode ser realizada utilizando vários solventes. Para as proteínas dos cereais, basicamente todos os métodos são baseados nos trabalhos pioneiros de Osborne. No entanto, a extração com solventes específicos para a cultura pode produzir uma classe de proteínas puras e oferecer informações importantes quanto à sua expressão (BEAN &LOOKHART, 2000).

As proteínas de reserva também são classificadas de acordo com a sua solubilidade, inicialmente proposta por OSBORNE (1924), que é um método utilizado até hoje para separar as proteínas de reserva em cereais. A albumina é solúvel em água, as globulinas solúveis em

solução salina, prolaminas em solução de álcool, e glutelinas solúveis em solução diluída de ácido/base. Essas proteínas podem ser encontradas nos diferentes tecidos do grão e em diferentes proporções nos cereais (SHEWRY &HALFORD, 2002).

2.1.1 Albumina e globulina

As albuminas e globulinas são sintetizadas nos estágios iniciais de formação, quando a camada da aleurona já se encontra totalmente desenvolvida, cerca de sete dias após a antese (DAA) (SOUZA,1996). As albuminas 2S são inicialmente definidas como grupo com base no seu coeficiente de sedimentação em torno de dois. Elas são largamente distribuídas nas eudicotiledôneas, principalmente em Cruciferae e Arabdopsis. São sintetizadas por único precursor e apresentam estrutura similar às proteínas heterodiméricas (SHEWRY et al., 1995).

As globulinas são as proteínas amplamente distribuídas no grupo de proteínas de reserva em plantas, não estão presentes somente em dicotiledôneas, mas também em monocotiledôneas e encontram-se localizadas no embrião e na camada externa da aleurona. Podem ser divididas em dois grupos baseado no seu coeficiente de sedimentação: 7S vicilinas-globulinas e 11S legumina-globulinas. Ambas são variáveis em suas estruturas que sofrem processos pós-transcricionais e possuem qualidade nutricional, sendo deficientes em metionina e cisteína. As globulinas 11S geralmente contêm um nível desses aminoácidos maior que as 7S vicilinas. As globulinas são mais estudadas em leguminosas como, feijão e soja (SHEWRY et al., 1995).

As globulinas 11S são as principais proteínas de reserva não somente para as leguminosas, mas também para outras eudicotiledôneas e alguns cereais. Elas consistem em seis pares de subunidades que interagem não covalentemente. Cada par dessas subunidades contém cerca de uma subunidade ácida de 40Kd e básica de 20Kd, ligadas por pontes de enxofre (-S-). Em arroz, são transportadas do lúmen do RE via complexo de Golgi para o vacúolo (MUNTZ, 1998).

2.1.2Prolaminas

As prolaminas estão entre as principais proteínas de reserva dos cereais e contam com cerca da metade de N total do grão, exceto em arroz e aveia, em que a glutelina é a principal proteína de reserva e as prolaminas são encontradas em baixos níveis (3-10%). O seu nome está relacionado à sua composição que é constituída predominante de prolina e sua composição varia cerca de 30-70%.

As prolaminas do arroz são compostas por três grupos de pequenas proteínas (SHEWRY et al., 1995). Também denominadas de zeínas quando contidas no grão do milho, correspondem a 70-80% do total de proteína e são classificadas em dois grupos: 19Kd e 22Kd (MUNTZ, 1998).

Esta também é considerada uma proteína de baixo valor nutricional por apresentar em sua composição baixos níveis dos aminoácidos lisina, triptofano e treonina. A ausência notável de lisina e triptofano está ligada ao balanço de N. É rica em ácido glutâmico (21 26%), leucina (20%), prolina (10%) e alanina (10%), mas deficiente nos aminoácidos ácidos e básicos.. Possui peso molecular de 10-16 KDa, é insolúvel em água e solúvel em solução de álcool, solução com alta concentração de uréia, solução alcalina forte com pH>11 ou detergente aniônico (SHEWRY &HALFORD, 2002).

2.1.3 Glutelina

A proteína glutelina possui valor nutricional semelhante ao da aveia e do centeio, pois contém os oito aminoácidos essenciais necessários para nutrição humana, entre os quais se encontram lisina e o triptofano (JULIANO, 1985).

Apesar de o arroz possuir um teor de proteína relativamente baixo, ele é rico em lisina quando comparado a outras fontes protéicas. Ressaltando, que a lisina é um dos principais limitantes em proteínas de reserva em cereais e a sua concentração, caracteriza o valor biológico do cereal. Os valores mais expressivos são encontrados no arroz (3,17 – 4,07 g / 16 gN) e os menores no trigo (2,3g/16gN) (EGUM, 1979).

Cerca de 80% da glutelina do grão localiza-se no endosperma, portanto, após o beneficiamento do arroz, o seu valor protéico é conservado, pois ela não é removida, como acontece com a camada de aleurona e do embrião (TECSON, 1971).

A glutelina é formada por duas subunidades de 22-23 e 39 KDa. Sua síntese ocorre no retículo endoplasmático, é iniciada nos primeiros quatro dias após o florescimento, sendo processada no complexo de Golgi e continua aumentando seu teor durante o desenvolvimento do grão, sendo finalmente acumulada em sítios de corpos proteicos do tipo II (YAMAGATA et al., 1982 e 1986; PALMIANO et al., 1986).

A glutelina é codificada por uma família multigênica e já foram isolados seis cDNAs diferentes. Clones de DNA da glutelina foram isolados e depois codificado o precursor polipeptídico para determinação da sua seqüência nucleotídica, (TAKAIWA et al., 1986). TAKAIWA et al., (1987), codificaram famílias multigênicas da glutelina de aproximadamente 10 genes por genoma haplóide.

Baseada em sua seqüência primária, a glutelina pode ser classificada em duas subfamílias: GluA e GluB, compartilhando 65% de homologia. Nutricionalmente a subfamília do grupo B é superior ao grupo A e, além disso, é responsável pelo maior acúmulo de lisina, principal aminoácido limitante nos cereais. O estudo dessas subunidades é recente e promissor para o melhoramento vegetal do arroz (KaatsubeTANAKA et al., 2004).

Análise de clones de cDNA mostram que a seqüência de aminoácidos da glutelina é semelhante 30-35% com as globulinas 11S das leguminosas e glicina na soja (TAKAIWA, 1986, OKITA et al., 1989). Genes que codificam a subunidade ácida – A e básica – B da glutelina, são sintetizados por um RNAm, que codifica o precursor da subunidade A e B das globulinas 11S. Através do estudo de um gene ancestral comum para glutelina no arroz e glicina na soja, HIGUCHI &FUZAWA (1987), verificaram que os genes envolvidos na codificação das proteínas de reserva 11S nas angiospermas podem ter sido originados de um gene ancestral comum. A homologia das seqüências da glutelina com a glicina da semente da soja pode revelar qualidades importantes para o melhoramento nutricional do arroz visando à seleção de características para o processamento de alimentos.

Nos cereais, as proteínas mais estudadas são as de reserva, que são polimórficas no tamanho e/ou carga (COOKE, 1984). No milho, o entendimento sobre a herança genética de controle do teor de proteína, é comandado pelo gene *opaque-2*, no aumento do conteúdo de lisina, porém, no arroz, ainda não se tem um conhecimento genético sobre o controle do teor da glutelina. Embora as subunidades da glutelina apresentem características físico-químicas semelhantes às demais proteínas e com o avanço de métodos analíticos, ainda assim, o progresso no melhoramento da qualidade protéica do arroz tem alcançado poucos resultados.

Por isso, o estudo desta proteína no arroz, não é importante apenas para o entendimento da expressão do seu gene, mas também para o aumento do valor nutricional da proteína no grão que serve de alimento para o ser humano e animal.

Vários trabalhos foram publicados relatando o efeito da adubação nitrogenada, a melhor época de aplicação, fonte de aplicação (nitríca e amoniacal) e genótipos mais vantajosos (ALTMAN et al., 1983; De DATTA et al., 1984; SOUZA, 1990) com objetivo de

melhorar a qualidade do grão. De acordo com o observado por SOUZA et al. (1993) o aumento do teor de proteína bruta é acompanhado por um aumento na fração de glutelina, isto é, um aumento no teor de proteína bruta é acompanhado de uma melhora da qualidade nutricional do grão.

2.2 Extração das Proteínas de Reserva

Vários autores já publicaram artigos referentes à extração de proteínas em cereais e sua diferenciação através do teor das proteínas de reserva. Bem antes da disseminação da tecnologia do DNA recombinante já existiam estudos de diversidade genética com culturas de interesse agrônomo e econômico. E para diferenciar cultivares com base nas proteínas de reserva não seria diferente, o que é refletido na literatura, pois, é possível encontrar diversificados métodos de extração de proteínas desde o século XVIII (OSBORNE, 1924; DEBYSHIRE et al. 1976; BARBA DE LA ROSA; PAREDES-LOÓPEZ E GUÉGEN, 1992; SHEWRY E CASEY, 1999; BEAN & LOOKHART, 2000).

Dentre os métodos empregados, a eletroforese em gel de poliacrilamida é um dos sistemas mais utilizados para identificação de proteínas desde as décadas de 70 e 80 sendo até hoje empregada com sucesso. No entanto, o custo e tempo necessários para o emprego desta técnica também influenciaram desde a sua concepção, promovendo dessa forma o surgimento de novos equipamentos e métodos alternativos, como a cromatografia.

2.2.1 Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos consistem num grupo de técnicas de separação de misturas, de modo que o mesmo instrumento faz a separação dos analitos contidos na amostra e sua quantificação. Esta técnica apresenta-se como uma alternativa bastante viável, eficiente e rápida, em comparação a métodos químicos e microbiológicos. Muitas misturas complexas, especialmente de origem biológica, só podem ser quantificadas usando cromatografia líquida ou gasosa. O processo da quantificação funciona, basicamente, pela adsorção do analito de interesse na fase estacionária. O tempo de retenção permite a separação das várias substâncias que compõem a amostra: analito(s) e interferentes.

Introduzida pelo pesquisador russo Michael Tswett em 1906, quando separou clorofila de uma mistura de pigmentos de plantas, através de uma coluna cheia de carbonato de cálcio em pó, fazendo a lavagem com éter de petróleo. Conforme a amostra descia pela coluna, apareciam bandas separadas e cores distintas. Palavra de origem grega, onde “cromo” significa cor e “grafia” significa escrita, ou seja, “escrita em cores”. Mas a cromatografia pode separar os componentes sem nenhum aparecimento de cor.

Da reunião de mais informações a partir de técnicas empregadas com alta resolução destacam-se a cromatografia e a eletroforese. A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) tem proporcionado muitas aplicações (LOOKHART & BEAN, 1995). O uso do HPLC é capaz de separar as proteínas através do tamanho, carga (cromatografia por troca iônica) e diferença na superfície de hidrofobicidade (fase reversa-HPLC) e a partir dele surgiram vários métodos de extração.

Recentemente, a caracterização de gliadinas para identificação varietal de cereais tem sido feita pela técnica denominada HPCE - Eletroforese Capilar de Alta Resolução, "High Performance Capillary Electrophoresis" (BIETZ & ZCHMALZRIED, 1995; BIETZ & LOOHART, 1994; WERNER et al., 1994). Conforme LOOKHART & BEAN (1995) o método é eficiente também na diferenciação em casos de cultivares com parentesco próximo ("*closed related*"), como linhas irmãs e intercruzamentos. A HPCE - Eletroforese de Alta Performance de Capilaridade, é uma combinação de eletroforese de alta resolução com a automação do HPLC. Ela é baseada num capilar de pequeno diâmetro (25 a 100µm) para

separação. Devido à sua grande razão área de superfície e volume, estes capilares permitem a separação em alta voltagem. 30 kV. Esta alta voltagem permite uma separação rápida e eficiente das proteínas (LOOKHART & BEAN, 1995). Embora os métodos sejam conhecidos e empregados a um bom tempo, a necessidade de automação para um trabalho com grande volume de amostras a um custo menor, ainda se faz necessária, pois nem sempre é acessível o uso de equipamentos como HPLC.

2.2.2 SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

O método eletroforético mais comumente empregado para separação das proteínas de cereais é o SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida), onde se adiciona o detergente SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) nas amostras (WEBER & OSBORN, 1969; U.K. LAEMMLI, 1970). SHAPIRO et al.(1967) descreveram a electroforese em gel de poliacrilamida em presença do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) e indicaram que neste meio a separação é dependente do peso molecular.

O detergente SDS é usado para desnaturar proteínas com várias subunidades e para cobrir as moléculas da proteína com cargas negativas. Deste modo, a carga intrínseca à proteína é mascarada, e a razão carga/massa torna-se constante. Assim, as proteínas são separadas em função do seu tamanho, tal como no caso das moléculas de DNA na eletroforese de ácidos nucleicos, em que as amostras aplicadas no gel migram no sentido do eletrodo positivo. Porém, como na maioria das técnicas, utiliza reagentes neurotóxicos como acrilamida. A maioria dos cereais tem em suas proteínas de reserva ponte dissulfeto, por isso, a necessidade de um agente redutor para extração dessas proteínas em análises de mobilidade eletroforética (BEAN & LOOKHART, 2000).

Em adição ao SDS-PAGE, a Focalização Isoelétrica (IEF) tem sido usada para separar proteínas de reserva de diferentes cereais, com base nos pontos isoelétricos. Nesta técnica, as proteínas migram até encontrar um pH no meio eletroforético que seja correspondente ao seu ponto isoelétrico. No entanto, o emprego de determinados reagentes, como uréia pode modificar as proteínas durante a IEF e os reagentes utilizados são caros.

Em estudos relacionados à quantidade, qualidade e comparação entre as diferentes proteínas de cereais é possível observar variações decorrentes dos processos de extração, teor de proteína, ambiente e também efeito do genótipo. Por isso, a importância da escolha do método a ser empregado.

2.3 Caracterização das Frações das Proteínas de Reserva em Plantas

A caracterização através das frações proteicas tem sido bastante utilizada atualmente, não mais com o propósito único de diferenciar genótipos, mas de selecionar os que apresentam as características de interesse para adição em programas de melhoramento vegetal.

AGBOOLA & MILLS (2005) realizaram um trabalho com arroz típico da Austrália comparando métodos de extração das proteínas de reserva derivado da extração por solubilidade (OSBORNE, 1924) e de HPLC. Os resultados mostraram pouca diferença entre os teores para todas as frações, no entanto, para glutelina, o método baseado no de Osborne ainda foi melhor (95,6%), pois com apenas uma tratamento enzimático, apesar da extração ser bem específica para cada grupo, ao realizar a extração de glutelina inicialmente eles observaram os menores valores (89,52%) e concluíram que é importante seguir a extração sequencial, ou seja, primeiro: albumina e globulina, prolamina e por último glutelina. NICANOR et al. (2006) também compararam os métodos de OSBORNE & BARBA De LA ROSA (1992), e concluíram que o de Osborne também é eficiente para separação das frações para frutos de Guava, eudicotiledônea típica do México.

A caracterização das proteínas de reserva não é realizada somente em cereais, mas também em outras espécies com valor nutricional. Por exemplo, o estudo em que VAZ et al. (2004) caracterizaram 17 espécies de *Lupinus albus*, uma leguminosa (tremoço) cultivada tradicionalmente em Portugal, empregando o método de Osborne e verificaram uma relação com a distribuição das proteínas de reserva: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas de acordo com o local de origem das variedades, e delas, a glutelina foi a principal proteína responsável pela diferença entre os genótipos.

2.4 Correlação entre Qualidade Nutricional x Fenótipo no Grão de Arroz

Analisando as características morfológicas de comprimento, largura e razão comprimento/largura do grão. ARAÚJO et al (2003) observaram uma correlação significativa para o teor de PB e as variedades classificadas em grãos do tipo curto e forma meio alongada. Ao comparar os grupos de variedades: elevado e baixo teor de proteína bruta com as características do grão, constatou-se que as variedades de grão do tipo curto a médio e de forma arredondada, menor comprimento e menor razão comprimento/largura possuíam os teores mais elevados de PB. Os dados apontaram uma correlação significativa entre PB e comprimento do grão ($r = -0,63$, $p < 0,05$) e sua razão comprimento/largura ($r = -0,72$, $p < 0,05$) que pode ser explicada pelo fato dos genes responsáveis por essas características estarem localizados na mesma região cromossômica (ARAÚJO, 2002).

KWARTENG et al. (2003) ao compararem características físicas, químicas e nutritivas entre variedades melhoradas e locais observaram que as variedades melhoradas tinham como características: um grão do tipo longo e razão comprimento/largura de 3,12 mm, boa aparência do endosperma e alto teor de amilose. No entanto, os valores correspondentes às características nutritivas foram superiores para as variedades locais como: PB, menor quebra dos grãos e maior teor de Ca e K.

Apesar do potencial que o arroz possui para o incremento da qualidade nutricional a demanda por grãos do tipo “longo e fino” e aparência do endosperma são os primeiros atributos utilizados para o seu consumo e conseqüentemente comércio.

A seleção de variedades para o melhoramento, tomando como base às características de produção, resistência e qualidade nutricional adaptada à sua região tradicional de cultivo, certamente são medidas que propiciarão uma contribuição inestimável para a agricultura no país. No entanto, a exigência do mercado por variedades com características morfológicas do grão acabou contribuindo para um melhoramento que não contempla as características nutritivas. Verificada a correlação negativa entre o acúmulo de PB em variedades que apresentaram uma menor relação comprimento/largura é desejável que esta característica seja um dos critérios de decisões tomadas para melhoramento genético. Pois, o uso de plantas com essas características associadas às de interesse agrônômico pode resultar em variedades melhoradas de boa qualidade nutricional e que as diferentes variedades de uma mesma espécie podem estar associadas às diferenças na eficiência de absorção, eficiência de assimilação e translocação de nitrogênio na planta (MOLL et al., 1982; NEYRA et al., 1988).

2.5 Estudo da Diversidade Genética em Plantas

A caracterização de variabilidade genética tem sido um dos principais interesses dos geneticistas de populações, por isso, os estudos da filogenia molecular ou evolução molecular e análise de diversidade genética são realizados desde o ano de 1900, mesmo antes da redescoberta dos trabalhos de Mendel.

A variação genética é uma condição fundamental para que haja evolução adaptativa uma vez que a seleção natural atua entre variantes que ocorrem dentro das populações em

função da adaptação ao ambiente, convergindo esta variação para avaliação entre populações e, finalmente entre as espécies. Isso é semelhante no melhoramento vegetal cujo objetivo é fixar variantes genéticas úteis dentro de cultivares através de cruzamentos seletivos. Conseqüentemente, ambos, evolucionistas e melhoristas, têm grande interesse na detecção, quantificação, qualificação e análise da variabilidade genética, ou seja, na sua caracterização (DOEBLEY, 1990).

Inicialmente, os estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, de fácil identificação visual, como: altura da planta, cor de pétala, morfologia foliar entre outros. A manutenção adequada de germoplasma depende, em grande parte, da avaliação e caracterização da variabilidade genética contida no mesmo. Esta avaliação contribui para prevenção de possíveis perdas genéticas, como as que podem acontecer durante as multiplicações dos acessos coletados e, possibilitam o estabelecimento dos sítios ou áreas de coletas que contenham maior variabilidade, auxiliando assim na planificação de novas coletas.

A aplicação de novos métodos acompanhados de modelos matemáticos propiciou um desenvolvimento na área da genética, principalmente nas medidas de distância genética entre populações e, posteriormente na elaboração de árvores que expressassem as diferenças observadas entre os organismos. A rápida acumulação de dados a partir da década de 1970 provocou um grande impacto na filogenia molecular. Dados de seqüências de DNA passaram a ser utilizados para a montagem de árvores filogenéticas em organismos proximamente (homens e macacos) ou distantemente relacionados (eucariotos, eubacteria e archaeabacteria). Portanto, os dados moleculares têm provido uma poderosa ferramenta de estudo da história evolutiva, de forma a possibilitar a reconstrução da filogenia dos maiores grupos de organismos vivos.

Entretanto, os métodos tradicionais de classificação dos organismos, como a morfologia, fisiologia e paleontologia estão longe de serem abandonados. Ao invés disso, deve-se prover dados complementares e mais precisos sobre as semelhanças e divergências de caracteres. A taxonomia baseada na morfologia e em dados anatômicos é ainda muito importante para a comparação com as informações paleontológicas disponíveis, já que o DNA de formas fósseis é quase impossível de ser recuperado.

2.5.1 Variabilidade genética detectada a partir de análise fenotípica

A seleção de plantas baseada em análise fenotípica ainda é tradicionalmente utilizada pela maioria dos melhoristas. Constituem uma estratégia de sucesso para características de alta herdabilidade quando o fenótipo reflete a constituição genética do indivíduo, mas não para características de baixa herdabilidade porque o fenótipo pode não refletir o genótipo. A maioria das características selecionadas no melhoramento de plantas é de natureza quantitativa o que pode mascarar os resultados devido à interação genótipo e ambiente. Desta forma, selecionar fenótipo é como perseguir um alvo móvel que muda com o ambiente, por isso, avaliações de variabilidade genética em germoplasma de plantas utilizando-se vários marcadores baseados na análise direta do DNA tem sido prática comum (POWELL et al., 1995; GALGARO et al., 1998; GIMENES et al., 2000, MANIFESTO et al., 2001).

A informação molecular de diversidade e distância pode auxiliar no direcionamento e enriquecimento da base genética durante o andamento de um programa de melhoramento, bem como na avaliação da redundância e deficiências das coleções de germoplasma, gerando dados sobre a eficiência do processo de coleta, manutenção, manejo e ampliação de um banco de germoplasma (PHILLIPS et al., 1993).

Diversos trabalhos que visam à determinação da divergência genética de cultivares e/ou genótipos de arroz, trigo, cevada, soja e outras culturas têm sido relatados, na forma de estudos, envolvendo as análises multivariadas (MARTIN et al., 1995). O uso de técnicas

multivariadas tem sido uma das opções mais recomendadas, pois, possibilita a avaliação simultânea de vários caracteres e, permite que inúmeras inferências possam ser feitas a partir do conjunto de dados existentes.

Na predição da divergência genética podem ser empregados vários métodos multivariados. Dentre esses se citam as análises por componentes principais e variáveis canônicas, que necessitam de uma medida de dissimilaridade, e os métodos aglomerativos que avaliam a similaridade dos genitores por intermédio de dispersão gráfica, que geralmente considera dois eixos cartesianos (CRUZ & REGAZZI, 1994).

De acordo com essa classificação, o método UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean* – Análise de Agrupamento pelo Método das ligações Médias entre Pares não Ponderados), o método de transformação de distância e o método de relações de vizinhos são abordagens de distância (SILVA, 1999 apud JONHSON & WICHERN, 1982). O método UPGMA utiliza um algoritmo de organizações sequenciais, nos quais as relações topológicas são identificadas por ordem de similaridade e a árvore filogenética é construída passo a passo. Ou seja, primeiro deve-se identificar dentro de várias OTUs (unidades taxonômicas que se deseja comparar), as duas que são mais similares e tratá-las como uma única, chamada de OTU composta. A partir daí são observados os outros grupos de OTUs e é identificado o próximo par com maior similaridade, que é novamente arranjado e assim por diante, até que sobrem apenas duas OTUs (SILVA, 1999).

2.5.2 Construção de mapas genéticos

A metodologia de construção de mapas genéticos integra um grande número de técnicas que incluem o desenvolvimento de linhagens progenitoras e populações segregantes adequadas, a identificação dos genótipos nos locos marcadores através de técnicas de biologia molecular e a utilização de diversas técnicas de análise estatística e estimativa de ligação e distância entre os marcadores. Para a maioria das características quantitativas, existem poucas informações sobre a posição cromossômica, magnitude do efeito e interações dos locos que controlam a sua expressão. Estes locos são denominados de QTL- *Quantitative Trait Loci*, ou seja, locos controladores de características quantitativas.

Para a construção de QTL é necessário inicialmente a avaliação fenotípica da população segregante, e considerar que, quanto maior a distância genética, mais fácil será a obtenção do polimorfismo. Geralmente, populações F₂ ou retrocruzamento F₁ são empregadas com este objetivo; entretanto, em plantas autógamas, populações de linhagens homocigotas são preferencialmente utilizadas, pois facilita a manutenção e multiplicação dos genótipos a serem estudados para o mapeamento, já em plantas alógamas que são altamente heterocigotas a maioria dos locos são altamente polimórficos e a seleção é um pouco mais complexa (GALE et al. 1990).

Vários mapas foram desenvolvidos com base nos marcadores morfológicos e isoenzimáticos (KLEINHOF, 1993) e, depois RFLP (REDOÑA & MACKILL, 1998), RAPD (CHAPARRO et al., 1994) e SSR (AKAGI et al., 1996). A construção do mapa genético estimula a aquisição de informações importantes para melhoramento genético de uma espécie.

No entanto, é importante ressaltar que, a aplicação de QTL em melhoramento vegetal deve ser realizada de maneira criteriosa e consistente, uma vez que o melhor marcador tende a variar conforme o ambiente de avaliação fenotípica.

2.6 Taxonomia Vegetal a partir de Caracteres Morfológicos

As classificações taxonômicas tradicionais ainda são baseadas nas análises fenotípicas, sendo que as avaliações mais empregadas são: estrutura, ultra-estruturas, fisiologia,

características imunológicas, citológicas, nutricionais, análise de lipídeos, suscetibilidade a antibióticos e fósseis (TAKATSU, 2000).

Embora existam inúmeras técnicas moleculares à disposição para estudos de divergência entre espécies muito próximas, informações convencionais fenotípicas de valor taxonômico ainda são essenciais, pois não adianta conhecer a seqüências de regiões do genoma se não podemos associá-la ao fenótipo.

A taxonomia de forma geral (vegetal, animal, bactéria e vírus) vem sofrendo mudanças radicais e rápidas em virtude da incorporação sistemática de métodos de caracterização molecular para classificação. Devido à rapidez com que estas mudanças vêm sendo operadas, até bibliografias recentes sobre classificação de espécies tornam-se rapidamente obsoletas.

Muito dos caracteres de importância agrônômica como rendimento e números de grãos por espiga, peso de grãos e rendimento da biomassa são controlados por um grande número de genes, cada um com pequeno efeito no fenótipo e são de difícil identificação e seleção. Marcadores de DNA que estão ligados a caracteres quantitativos podem ser identificados e seguidos nas populações segregantes de forma segura. Para muitas espécies, marcadores moleculares ligados a caracteres quantitativos de interesse já foram identificados (FREDERIZZI, 1998).

A caracterização morfológica em programas de melhoramento é muito importante porque auxilia na identificação de amostras de um mesmo material que às vezes recebe nomes diferentes e acaba sendo armazenado mais de uma vez, sendo desvantajoso em termos de preservação do material genético, pois, reduz o espaço que seria disponível para novas amostras. A avaliação da variabilidade genética em germoplasmas depende da disponibilidade de marcadores polimórficos e neutros do ponto de vista do efeito ambiental. Neste sentido, avaliações de variabilidade genética em germoplasma de plantas realizam-se com o uso de vários marcadores baseados na análise direta do DNA.

Com o advento da biotecnologia, o mapeamento genético em plantas tem avançado enormemente em estudos associando características morfológicas e moleculares, permitindo um conhecimento mais avançado da planta e dessa forma, aumentando a eficiência no desenvolvimento de novos genótipos através do melhoramento vegetal. Neste sentido, as características botânicas passam a ser o foco de informações essenciais para a implantação da seleção assistida por marcadores moleculares.

2.7 Marcadores Moleculares na Conservação de Germoplasma Vegetal

As características que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente são conhecidas como marcadores moleculares. As técnicas de “marcadores moleculares” atualmente são bem utilizadas na biologia molecular, pois fornecem um conhecimento em nível genômico das plantas, auxiliando nas decisões de melhoramento vegetal, como incorporação de características desejadas em outras variedades ou populações em diferentes etapas do melhoramento, utilizando-se os meios clássicos de recombinação (THOMAS, 1993; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma passíveis de serem detectadas e cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo, porém, a sua seqüência de nucleotídeos e função, na maioria das vezes é desconhecida (GOSTIMSKY et al., 1999). Por isso, inúmeras técnicas têm sido comuns na detecção de variabilidade genética ou polimorfismo genético em organismos.

Esses marcadores, em plantas, exercem uma importante função no mapeamento cromossômico, identificação e clonagem de genes, melhoramento e criação de novas variedades, permitindo o conhecimento da variabilidade genética e identificação em níveis genéticos intra e interespecíficos (WILLIAMS et al., 1993; GOSTIMSKY et al., 1999).

Na história da biologia molecular, a técnica da PCR¹ desde a sua concepção causou um grande impacto na análise genética de vegetais propiciando o desenvolvimento de outras classes de marcadores moleculares como: a RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso); WILLIAMS et al., 1990), SSR (Seqüências Curtas Repetidas, LITT & LUTTY, 1989) e STS (Detecção de uma Seqüência ou loco por PCR Específico, PARAN & MICHELMORE, 1993) e AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados; VOS et al., 1995). No entanto, atributos como consistência e tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são importantes para a implantação de marcadores moleculares na rotina de um programa de melhoramento.

Muitos métodos tradicionais de clonagem e seqüenciamento foram acelerados ou substituídos por técnicas derivadas da PCR, possibilitando uma análise mais precisa da variação genética capaz de detectar qualquer alteração mutacional (mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos), em regiões codificadoras e não codificadoras do genoma, de um número ilimitado de genes.

2.8 Marcadores Moleculares Utilizados na Identificação de Cultivares

O aumento na eficiência de seleção, o melhor conhecimento e caracterização do germoplasma e a maximização dos ganhos genéticos têm sido objetivos da maioria dos melhoristas. Novas formas de alcançar estes objetivos têm sido continuamente investigadas para o melhoramento de plantas gerando um grande interesse em tecnologias como as de marcadores de DNA ou moleculares.

Em termos de variabilidade genética, marcadores moleculares permitem compreender e organizar a variabilidade genética de um programa de melhoramento de forma única, isto é, acessando variabilidade de DNA, que não é influenciado pelo ambiente, como o são, por exemplo, os caracteres morfológicos e fenotípicos em geral de uma planta.

E, como consequência temos a possibilidade de planejar os cruzamentos em programas de melhoramento, de forma a maximizar as diferenças genéticas entre genótipos elites, diferenças essas que muitas vezes não são observadas quando analisadas o fenótipo. E em segundo lugar, a possibilidade de organizar o germoplasma do programa em *pools* gênicos, facilitando a escolha e diminuindo o número de combinações a serem feitas pelo melhorista (MILACH, 1998).

Como consequência do estudo da variabilidade genética, muitas vezes é possível identificar o padrão molecular (*fingerprinting*) de genótipos de interesse, que pode ser posteriormente utilizado para a proteção do germoplasma.

Marcadores moleculares podem ser empregados também na seleção de características de interesse. Neste caso, é necessário inicialmente identificar marcadores associados a essas características através do mapeamento molecular (MILACH, 1998). Uma vez que esta informação esteja disponível, é possível selecionar os indivíduos com o marcador de interesse, sem que ocorra necessidade de se avaliar o fenótipo dos mesmos.

Com a rápida evolução e automação das tecnologias de marcadores moleculares, os que são mais utilizados em estudos genéticos e programas de melhoramento são os marcadores derivados da PCR: RAPD e SSR (microssatélites).

2.8.1 RAPD

A técnica de RAPD baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de iniciadores (pequenas seqüências complementares de DNA) que se anelam nos dois extremos

¹ A reação de PCR, envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de DNA em presença da enzima *DNA polimerase*, permitindo o aumento de quantidades mínimas de uma região específica do DNA. E, baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de iniciadores (primers) cujas seqüências são complementares às seqüências que flanqueiam a região alvo de DNA.

opostos de uma das fitas de DNA dupla hélice que servem como moldes. Na técnica da RAPD, utiliza-se apenas um único iniciador ao invés de um par como na PCR e esse iniciador tem sua sequência arbitrária, e, portanto desconhecida a região a ser amplificada.

WILLIANS et al. (1990) foram os primeiros a otimizar a técnica da RAPD colocando-a como importante ferramenta para obtenção do padrão molecular ou diferenciação de grupos locais e populações; no estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies; na construção de mapas genéticos e localização de genes de interesse (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). KRISHNA & JAWALI (1997) conseguiram otimizar a técnica de RAPD com DNA extraído da metade da semente das culturas de algodão, aveia, feijão e ervilha. Enquanto, McDONALD et al. (1994) conseguiram com as culturas milho, soja, amendoim, trigo e trevo vermelho.

Alguns trabalhos tentaram correlacionar as variações morfológicas da semente com análise através da RAPD (ARAÚJO, 2002 e DAHLBERG et al., 2002), mas não houve coincidência, até porque parte de seus fenótipos são controlados por grupos de vários genes que são condicionados pelo fator ambiental, e alguns destes, encontram-se em regiões muito pequenas do genoma, difíceis de serem detectadas pela RAPD.

É importante salientar, que para a utilização desta técnica é necessário uma eficiente extração de DNA. Por isso, vários protocolos foram desenvolvidos e podem ser utilizados, adequando-os especificamente à espécie em estudo. Os mais comumente utilizados para os vegetais são os baseados na solução tampão de extração CTAB (Brometo de Cetil trimetilamônio). Este método de extração é bastante eficiente para espécies de brassica, milho e arroz, entre outras (WILLIANS et al., 1993).

Um dos fatores limitantes da técnica RAPD é o baixo número de informações fornecido por *loci*, pois apenas um loco é detectado, enquanto as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. O caráter dominante dos produtos da RAPD impossibilita a diferenciação entre heterozigoto (Aa), resultando na perda de informação necessária, para estimativa da frequência alélica nas populações em estudos genéticos ou para mapeamento genético baseado em experimento com segregação F₂, isto é, no gel, considera-se que a ausência de banda pelo genótipo homozigoto recessivo (aa) e a presença de banda é causada pelos genótipos homozigotos dominantes (AA) ou os heterozigotos (Aa) (WILLIANS et al., 1993). Uma alternativa para a detecção de heterozigotos a partir da RAPD seria um experimento com segregação de marcadores em progênies lado a lado com os parentais, ou o uso de sondas de hibridização contra o outro segmento suspeito de co-dominante (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O DNA resultante desse tipo de extração em geral, é amplificado sem maiores problemas para a maioria das espécies. A concentração e pureza também são fatores ligados diretamente ao sucesso da técnica da RAPD, pois altas concentrações de DNA resultam na falha da reação devido à alta concentração de impurezas agregadas, enquanto que a baixa concentração de DNA resulta em uma amplificação não correspondente e algumas bandas são perdidas (WILLIANS et al., 1993).

A reprodutibilidade dos resultados requer uma otimização e estrito controle das condições de reação. Considerados pontos chave, juntamente com a concentração de DNA, cita-se a concentração de magnésio, enzima DNA polimerase, temperatura de anelamento e qualidade da agarose que também podem afetar o número de amplificações bem como, sua intensidade e sua separação (GOSTIMSKY et al., 1999; WILLIANS et al., 1993). Sob baixas temperaturas de anelamento (30-35°C), os iniciadores ligam-se a certas sequências de DNA localizados na fita oposta à do DNA genômico. Ao se utilizar ciclos rápidos e com mudanças de temperaturas entre as etapas de anelamento e extensão, as bandas no gel podem ser perdidas ou ficarem menos intensas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de RAPD é amplamente utilizada para a obtenção de “impressões digitais” genômicas de indivíduos, variedades e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, taxonomia moleculares, diagnósticos genéticos para o melhoramento de plantas e identificação de duplicatas em bancos de germoplasma, estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies e a obtenção de dendrogramas (GE et al., 1999; GOTIMSKY et al., 1999; QIAN et al., 2001; VERMA et al., 1999; VIRK et al., 1994; XAVIER, 2000).

A partir dessa técnica é possível construir dendrogramas que possibilitam a avaliação do grau de similaridade entre as espécies e suas relações intra e interespecíficas. Os métodos “*Unweight Pair-group*” (UPGMA) e NT (“*Neighbor-Joining Pair-Group*”) têm sido os mais utilizados nas análises de agrupamento (GOTIMSKY et al., 1999). MACKILL (1996) utilizou o método UPGMA para diferenciar variedades de arroz oriundas do Japão e Índia. KOKAEV et al. (1998) também através da análise de agrupamento, elaboraram um dendrograma que permitiu a verificação das diferentes variedades de ervilhas e mutantes.

2.8.2 Microssatélites-SSR

A técnica de microssatélites ou Sequência Curtas Repetidas -SSR é atualmente uma das melhores opções para a caracterização de cultivares em germoplasma. Constituem curtas seqüências de di, tri, tetra ou penta nucleotídeos repetidos e concatenados (lado a lado) que são encontrados abundantemente por todo o genoma de eucariotos e alguns procariotos (TAUTZ & RENZ, 1984). Essas seqüências são muito instáveis, estando sob alterações mutacionais a taxas muito maiores do que as observadas para as seqüências de cópia única. Esta técnica vem ganhando uma rápida aceitabilidade como técnica para análise de diversidade genética em germoplasma de arroz, pois, reúne codominância, natureza multialélica, facilidade de detecção pela PCR, abundância e distribuição ao acaso por todo o genoma, gerando grande quantidade de informação.

O deslizamento (slippage) da DNA polimerase durante a replicação do DNA é tida como a principal causa da variação no número de repetições nesses locos (SCHLOTTERER e TAUTZ, 1992). Os diferentes números de repetições caracterizam os diferentes alelos, que podem ser detectados numa eletroforese em gel de poliacrilamida.

Análises de diversidade genética através de marcadores do tipo RAPD e RFLP dificultam a integração dos dados devido a pouca repetibilidade, baixo polimorfismo e erros na interpretação dos resultados obtidos, uma vez que um grande número de *loci* é detectado ao mesmo tempo em uma única análise.

Entre as vantagens apresentadas pelo marcador microssatélite para avaliação de germoplasma, podemos considerar as seguintes:

1 - Codominância: a possibilidade de detecção de todos os alelos em um dado loco em um dado indivíduo, o que permite a determinação de todos os alelos presentes em uma população e o cálculo das suas freqüências;

2 - Elevado número de alelos: isto é, alto polimorfismo intraespecífico em cada loco, o que torna este loco informativo em populações diferentes permitindo a caracterização de diferentes acessos em uma coleção;

3 - Praticidade na integração e comparação dos dados obtidos: decorrente do fato dos mesmos serem analisados por PCR utilizando-se "iniciadores" específicos que permitem a amplificação de locos individuais.

Os primeiros trabalhos utilizando microssatélites foram realizados em meados da década de 80. Desde então, os métodos de isolamento de *loci* de microssatélites têm sido aperfeiçoados e vários protocolos publicados. Amplas revisões sobre o assunto podem ser encontradas em CHO et al (2000), TEMNKY et al. (2000) e ZANE et al. (2002). A utilização da técnica de marcadores microssatélites (SSR) foi bastante limitada no início, pois era necessário o desenvolvimento de mapas genéticos de marcadores SSR específicos, sendo trabalhoso e com um custo final muito elevado. Com o avanço da análise genômica em plantas e automatização de técnicas de seqüenciamento, é possível encontrar iniciadores que cobrem todo o genoma do arroz. As primeiras publicações referentes ao arroz foram: CHO et al (2000), AKAGI et al. (1997); PANNAUD et al. (1996) CHE et al. (1997) entre outros que se encontram registrados no banco de dados Rice Genes (<http://www.gramene.org>, verificado em 05 de maio, 2003).

O conhecimento sobre os níveis de variabilidade genética no germoplasma de uma espécie é de grande importância, pois permite acompanhar a manutenção desta variabilidade durante a multiplicação dos acessos e contribui com informações que possam melhorar a amostragem em casos como formação de uma coleção núcleo.

Outra vantagem do uso de microssatélites na análise de variabilidade genética é a detecção de locos únicos utilizando-se condições altamente estridentes (temperaturas de anelamento altas: 55 a 60°C). Isso facilita a comparação dos dados obtidos por diferentes pesquisadores e ao longo do tempo com o mesmo material. A alta temperatura de anelamento dos iniciadores oferece ao pesquisador a certeza de estar analisando um loco específico.

Na técnica de microssatélites uma vez feita a triagem de iniciadores, os trabalhos posteriores podem empregar apenas aqueles selecionados nos estudos iniciais, possibilitando resultados muito mais consistentes e reprodutíveis, como nos estudos de BLIGH et al. (1995), que conseguiram localizar a região no genoma ligada ao gene *Waxy*, que controla o teor de amilose, com a utilização de apenas dois iniciadores microssatélites; e o de JUNJIAN et al. (2002) que diferenciaram os subgrupos *indica* e *japônica* em 38 espécies de *Oryza sativa* com apenas seis iniciadores microssatélites.

Apesar da sua ampla popularidade e uso crescente em diversas áreas, deve-se recordar que os microssatélites apresentam também, além do custo de desenvolvimento, algumas limitações específicas:

- a. **Genotipagem:** a genotipagem é realizada determinando o comprimento do produto de PCR obtido que contém o microssatélite. As diferenças observadas (polimorfismo) são atribuídas a alterações no número de unidades repetidas, que estão relacionadas à alta frequência de mutações que ocorrem nestas seqüências. Porém, é possível que pequenas inserções e/ou deleções aconteçam nas regiões adjacentes que não necessariamente alteram o número de repetições, mas sim alteram o comprimento do fragmento gerado. Nesses casos, a determinação do número de repetições a partir de um fragmento clonado e a sua posterior utilização para amplificação em outras espécies, sem seqüenciamento, pode conduzir a erros na estimativa das distâncias genéticas.
- b. **Alelos nulos:** A ocorrência de mutações de ponto, inserções ou deleções, no sítio de anelamento do iniciador pode impedir a amplificação de um dado loco de microssatélite. Se as alterações não estiverem fixadas na população, somente uma parte dos alelos amplificará. Os alelos não amplificados são denominados de "alelos nulos" (PEMBERTON et al., 1995). O não conhecimento desta limitação poderá provocar uma estimativa errônea do número de genótipos homozigóticos presentes na

população. Em muitos casos o redesenho dos "iniciadores" conduzirá a amplificação da totalidade dos alelos.

- c. **Taxas mutacionais:** Correlações positivas entre o comprimento da seqüência do microssatélite e a taxa de mutação não são sempre verdadeiras, e podem provocar erros na estimativa das distâncias genéticas. Os atuais modelos mutacionais consideram como igualmente prováveis a ocorrência de mutações que aumentam ou diminuem o número de unidades repetidas no microssatélite, independente do seu tamanho.
- d. **Frequência entre organismos:** A aplicação deste marcador em um número cada vez maior de organismos tem revelado que a abundância de seqüências repetitivas varia significativamente entre espécies. Enquanto algumas espécies contêm um número suficiente de microssatélites para estudos populacionais, outras apresentam poucas seqüências deste tipo.
- e. **Artefatos de PCR:** Teoricamente, a técnica de PCR permite a amplificação de microssatélites a partir de uma única célula. Porém, estudos recentes demonstraram que a amplificação de microssatélites a partir de pequenas quantidades de DNA está associada à alta frequência de erros (SCHLÖTTERER & PEMBERTON, 1998). Dois tipos comuns de erros neste caso são: a amplificação de alelos com comprimento incorreto e a não amplificação de um alelo nos indivíduos heterozigotos. Uma precaução que deve ser tomada nesses casos é a amplificação do mesmo loco várias vezes para evitar erros na genotipagem.

2.9 Detecção de Polimorfismo Vegetal a partir de DNA Extraído da Semente

As análises por PCR usando DNA proveniente das sementes abrem possibilidade para rápido desenvolvimento através da seleção virtual de *locus* no genoma, incluindo os ligados aos principais genes de interesse agrônomo, QTL's e é opção para estudos de diversidade genética, identificação de genótipos e detecção de transgênicos em curto prazo, pois, a obtenção do material é direta e pode ser usada em larga escala dependendo do método.

O uso de DNA extraído da semente pode ser mais vantajoso, comparado ao tecido foliar que requer tempo para a germinação e emissão de folhas e, dependendo da espécie, chega a demorar no mínimo oito dias e, além disso, o co-isolamento de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários é o principal problema encontrado no isolamento e purificação de DNA vegetal. Folhas das diversas espécies de *Passiflora*, por exemplo, possuem níveis variados desses compostos que podem comprometer este procedimento (MOLINARI & CROCHEMORE, 2001) e conseqüentemente inibirem a amplificação pela PCR.

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos cuja extração de DNA é obtida apenas com uma pequena parte da semente (CHUNWONGSE et al., 1993; BENITO et al., 1993; ZHAI et al., 1996; KRISHNA & JAWALI, 1997; McCARTHY, 2002) o que oferece uma opção ao melhorista de germinar somente os genótipos selecionados e identificar *cross-over* em pequenos intervalos genéticos (menor que 1cM), dispensando, dessa forma, o manuseio com um grande número de plantas segregantes (MESSEGUER et al., 1991), pois com a outra parte da semente é possível desenvolver plantas vigorosas e sadias (CHUNWONGSE et al., 1993; McCARTHY, 2002) já contendo as características de interesse, tornando viável o melhoramento e análise de divergência genética entre acessos de banco de germoplasma em larga escala (Figura 1).

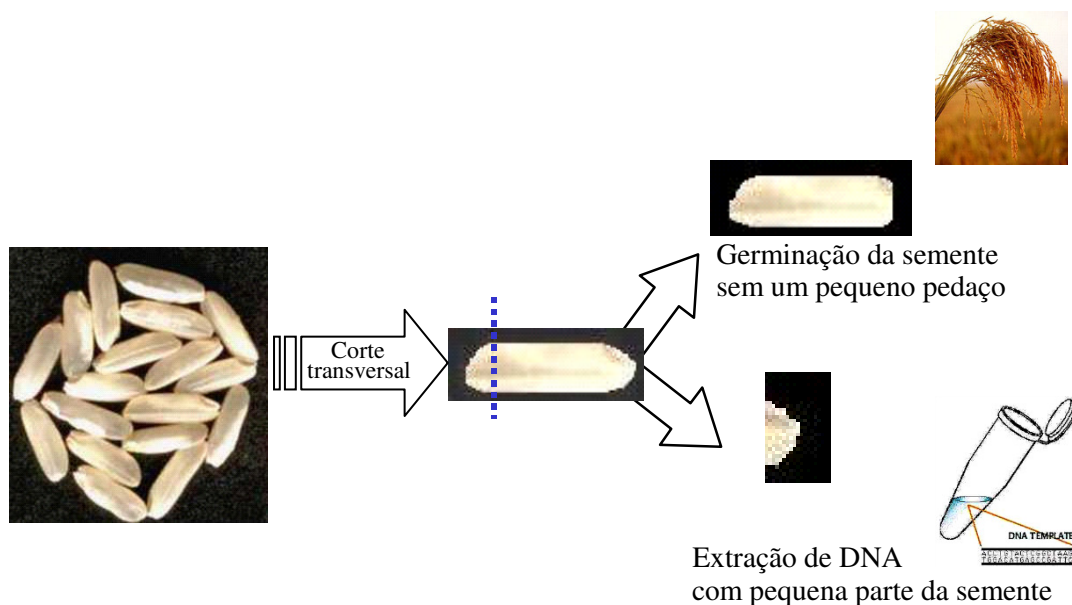


Figura 1. Esquema da extração do DNA da metade do embrião a partir da semente.

A quantidade de DNA obtido a partir da extração da semente é semelhante à obtida do tecido vegetal e já foi aplicada com sucesso em arroz (CHUNWONGSE et al., 1993; ZHAI et al., 1996), trigo (McCARTHY, 2002), algodão, ervilha, aveia e feijão (KRISHNA & JAWALI, 1997). Entretanto, nem todas as espécies vegetais são passíveis de ser usada essa técnica, uma vez que a anatomia da semente e a forma do embrião podem dificultar o corte e inviabilizar a germinação da outra metade da semente. No tomate, por exemplo, a forma do embrião é em espiral, sendo difícil o corte sem comprometer a germinação da semente.

Embriões localizados na porção distal das sementes e não muito pequenos são os mais apropriados para serem usados nesta técnica. Espécies de Brassica e Solanaceas, por exemplo, apresentam embriões bem pequenos (CHUNWONGSE et al., 1993).

Por outro lado, o que restou da semente após a remoção de pequeno pedaço poderia reduzir sua viabilidade e torná-la mais suscetível à infecção por patógenos. Porém, Chunwongse et al. (1993) e McCarthy, (2002) verificaram que a taxa de germinação para as sementes com metade do embrião não foi tão inferior a com sementes inteiras, sobrevivendo à transferência para o solo e, em testes com fungicida houve aumento da taxa de sobrevivência das sementes cortadas. Ainda, as sementes sem casca germinam mais rapidamente.

A seleção de genótipos de interesse agrônômico exige um manejo com grande número de plântulas o que aumenta a probabilidade de erro nas análises, pois, exige espaço para manutenção de plantas em casa de vegetação ou campo que ficam sujeitas ao ataque de pragas, estresse ambiental e até perda de resultados importantes durante a seleção.

A análise do genótipo realizada diretamente da semente é sem dúvida uma excelente opção para o melhoramento vegetal quando auxiliado pelos marcadores moleculares microssatélites, pois oferece a informação da planta antes mesmo de ser germinada, reduzindo dessa forma, custo, tempo e espaço. Nesse sentido, os microssatélites podem ser considerados marcadores moleculares mais apropriados atualmente no estudo de populações naturais, já que permitem a obtenção de informações cruciais sobre a biologia de populações naturais, tais como, fluxo gênico, migração, tamanho efetivo, sistema de cruzamento entre outras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de arroz analisadas nesse trabalho foram colhidas em dois experimentos conduzidos por AREIAS (2004). Sendo, o Experimento I realizado no período de agosto de 2002 a março de 2003 e o Experimento II de novembro (2002) a junho de 2003 (Tabela 1).

A determinação das medidas do comprimento, da espessura, da largura e razão comprimento/largura de acordo com o Serviço Nacional de Cultivares (SNPC,1999).

Tabela 1. Variedades locais de arroz do Estado do Maranhão.

Variedade	Nº de Acesso	Local de Origem
Bacaba	790098	S.J. do Sóter
Bacaba Comprido	220021*	Vitória do Mearim
Bacabinha	790157	Porto Franco
Bacabinha	220027*	Vitória do Mearim
Bacabinha Roxo	220005*	Vitória do Mearim
Canela de Ferro	220025*	Miranda Norte
Canela de Ferro	790164	Monção
Jatobá	790165	Pindaré
Jatobá	220012*	Vitória do Mearim
Lageado	220006*	Arari
Lageado	790001	S.J. dos Patos
Lageado Liso	220029*	Vitória do Mearim
Lageado sem Pelo	220018*	Arari
Pingo d'água	220026*	Viana
Pingo d'água	790148	Santa Luzia
Pingo d'água	220019*	Penalva
Zebu	790028	S.J.dos Patos
Zebú Branco	220028*	Vitória do Mearim
Zebú Branco	220017*	Penalva
Zebú Branco	220004*	Viana

*Amostras provenientes da Baixada Maranhense (Araújo, 2002).

3.1 Análise de Proteína Bruta (PB) no Grão

O teor de nitrogênio total (Nt) e proteína bruta (PB) foram determinados mediante a técnica de digestão sulfúrica (TEDESCO, 1995) em amostras contendo 20 grãos descascados manualmente. A extração das frações protéicas foi realizada para cada amostra com quatro repetições. O resultado de cada amostra, na análise de Nt foi multiplicado por 5,95; fator

baseado em 16,8% de glutelina que é a principal proteína de reserva do arroz (JULIANO, 1985).

3.2 Extração das Frações Protéicas

As extrações de proteínas de reserva foram baseadas nos métodos propostos por OSBORNE (1924) e adaptado por SOUZA (1996).

3.3 Extração Sequencial das Frações Protéicas

Os grãos foram descascados, moídos e transformados em farinha até atravessarem uma peneira de 60 mesh e depois foram transferidos 100mg de farinha para um microtubo de centrífuga com capacidade de 0,2mL. Esse procedimento foi realizado para todas as amostras com quatro repetições para cada determinação. As extrações sequenciais tiveram como base o método de OSBORNE e adaptações para aumentar o número de determinações (amostras) por extração.

3.3.1 Albumina + globulina

À farinha de arroz adicionou-se 2mL de solução 0,5 M NaCl e deixou-se em agitação por 30 minutos. Após esse período, centrifugou-se a 10.000g em temperatura de 5°C por 15 minutos. O sobrenadante foi reservado (sob temperatura de -20°C) e repetiu-se o processo.

3.3.2 Prolamina

Ao resíduo da extração anterior foi adicionado 2 mL da solução 60% 2-propanol que ficou sob agitação durante 45 minutos e depois centrifugada a 10.000g em temperatura de 5°C. O sobrenadante foi reservado (sob temperatura de -20°C) e repetiu-se o processo.

3.3.3 Glutelina

Ao resíduo derivado da extração das prolaminas adicionou-se 2mL da solução 0,5% NaOH que ficou sob agitação durante 60 minutos e depois centrifugada a 10.000g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi reservado (sob temperatura de -20°C) e o processo foi repetido mais duas vezes.

3.4 Determinação do Teor das Proteínas

As proteínas extraídas foram verificadas através de gel de poliacrilamida 14% SDS-PAGE (Sistema Mini-PROTEAN-3, Bio-Rad Laboratories, USA) (LAEMMLI, 1970). O gel foi constituído por um gel de empacotamento (SDS 0,1%; acrilamida 6%; bis-acrilamida 0,25%; Tris-HCl 0,75 M, pH 6,8; TEMED 0,04% e persulfato de amônio 0,08%) e um gel de resolução (SDS 0,1%; acrilamida 12%; bis-acrilamida 0,06%; Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8; TEMED 0,02% e persulfato de amônio 0,5%). A eletroforese foi efetuada em tampão Tris-glicina (Tris base 6,06 g/L, glicina 28,8 g/L e SDS 1 g/L), a 100V até a frente de azul de bromofenol atingir o final do gel resolução. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e verificado em luz branca e capturada sua imagem em sistema de fotodocumentação.

O teor de proteína em cada extração foi determinado segundo BRADFORD (1976) utilizando como padrão de BSA (albumina de soro bovino) de 10-1000µg/0,1mL.

3.5 Diversidade Genética em Variedades de Arroz através da Técnica de RAPD

3.5.1 Extração de DNA vegetal

Foram testados métodos para extração de DNA vegetal a partir do tecido da semente. Para o tecido foliar usou-se o método CTAB (GRATAPAGLIA E FERREIRA, 1998). Foram testados três protocolos, o primeiro baseado em EDWARDS et al. (1991) e modificado por McDONALD (1994) (Protocolo 1), o segundo por McCARTHY et al. (2002) com algumas modificações (Protocolo 2) e o terceiro de acordo com BENITO et al. (1993) e KRISHNA & JAWALI (2000).

a) Protocolo 1:

Uma parte do endosperma equivalente à metade do embrião foi removida da semente e transferida para um microtubo (1,5mL) e macerado com auxílio de um bastão de plástico em 100µL da solução tampão de extração (200mM Tris-HCl [pH 7,5], 288mM NaCl, 25mM EDTA e 0,5% SDS). Adicionou-se mais 900 µL dessa solução tampão e depois agitou-se no vortex por 30 segundos seguidos de centrifugação durante 2 minutos a 10.000g.

- O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e centrifugado por 4 minutos a 10.000g, o sobrenadante novamente transferido para outro microtubo. Foram adicionados 900 µL de isopropanol absoluto para permitir a precipitação do DNA ficando em repouso por 2 minutos. Depois, centrifugou-se por 7 minutos a 10.000g. O material e o pellet com DNA foi seco à vácuo por 15 minutos. Em seguida, o DNA foi ressuspensionado em 150 µL de solução TE (10mM Tris-HCl [pH 7,5], 1mM EDTA) e o DNA foi armazenado em freezer a -20 °C.

b) Protocolo 2:

Em um microtubo de centrífuga (1,5mL) contendo a amostra, adicionou-se 500µL de solução tampão de extração (7M uréia, 2% SDS, 5 mM EDTA) e misturou-se bem com auxílio de um bastão de plástico.

Um mesmo volume da mistura 1:1 de fenol:clorofórmio (clorofórmio/álcool isoamílico 24:1) foi adicionado e agitado em vortex para posteriormente ser centrifugado a 10.000g por 5 minutos. Cerca de 400µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e, então, adicionados lentamente 0,3 volumes de etanol 95%, para precipitação dos carboidratos solúveis. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000g e o sobrenadante foi novamente transferido para um microtubo novo e adicionado 0,1 volume de acetato de sódio (3M) e 0,7 volume de isopropanol, sendo gentilmente misturado pela inversão do tubo. Depois se centrifugou por 10 minutos a 10.000g em 4°C. Os pellets foram secos a vácuo e o DNA foi ressuspensionado em 50µL de TE (0,01M Trs-HCl [pH 8,0], 0,001M EDTA). O DNA foi armazenado em freezer a-20°C.

c) Protocolo 3:

Em um microtubo (1,5mL) contendo a amostra, adicionou-se 60µL de solução tampão de extração (100mM Tris HCl-pH 8,0, 50 mM EDTA, 500mM NaCl), 6µL de SDS (20%) e misturou-se com auxílio de um bastão de plástico.

As amostras foram submetidas a um banho-maria a 65°C por 10 min e depois adicionados 20µL de Acetato de Potássio 5M. E, em seguida, homogeneizadas através do vórtex e incubadas a 20°C por 10 minutos.

Depois, o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 10.000g em 4°C. Retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para um tubo novo e adicionou-se um mesmo volume de uma mistura 1:1 de isopropanol (75%) e acetato de amônio (2,5 M). Os tubos foram agitados no vórtex e novamente centrifugados por 10 minutos a 10.000g em 25°C.

O pellet obtido foi lavado com etanol (75%) e seco à vácuo. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de TE (0,01M Tris-HCl [pH 7,4], 0,001M EDTA) e em seguida, armazenado em freezer a -20 °C.

3.5.2 Verificação da extração do DNA e quantificação

A avaliação da qualidade e eficiência do DNA extraído foi efetuada de duas formas.

Primeiramente, fez-se um gel de agarose (1%) com 3 µl do material extraído. O gel foi submetido a uma voltagem de 100V por 30 minutos. Em seguida corado em solução de brometo de etídio (5mg/mL), lavado em água destilada e visualizado por meio de um transluminador UV.

Para a quantificação do DNA, foi retirada uma alíquota de 1 µL do material (diluído 1000 vezes) e depois se fez a leitura nos comprimentos de onda 260 e 280 nm em espectrofotômetro UV/VIS. A quantidade de DNA foi estimada pela relação A260/A280, em que cada unidade de absorbância correspondeu à concentração de 40 µg/mL de DNA de fita simples (SAMBROOK et al., 1989).

3.5.3 Técnica de RAPD

A técnica da RAPD (WILLIAMS et al., 1990) teve sua reação de amplificação adaptada por ARAÚJO (2002) apresentando um volume final de 16 µL, contendo 1,2 x de Tampão 10 x (Kit Promega), 2,3 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM do *primer*, 3 µg/µL de BSA, 1,0 unidade Taq polimerase, 17 ng de DNA molde, completando o volume final com água ultra pura. Para cada reação, fez-se uma testemunha, sem o DNA (substituído por água) para certificar de que não houve contaminação. Foram utilizados iniciadores dos Operon Technologies, Kit A (já empregados em estudos de diversidade genética de arroz), com conteúdo GC de 60 a 70%. Cujas sequências são: A2: 5'GTCCGAGCTC'3'; A3: 5'AGTCAGCCAC 3'; A4 5' AATCGGGCTG 3'; A10 5'GTGATCGCAG3'; A18: 5'AGGTGACCGT 3'.

A reação foi constituída dos seguintes ciclos:

- 94°C durante cinco minutos (desnaturação inicial), seguidos de 45 ciclos de:
- 30 segundos a 94°C (desnaturação);
- 35°C durante 1 min. (anelamento);
- 72°C durante 2 min. (extensão);

Após os 45 ciclos, a extensão foi complementada com 72°C por cinco min. As amostras foram conduzidas em um termociclador Eppendorf. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% em solução tampão TBE 0,5x com voltagem de 100V por 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, lavado em água destilada e visualizado e capturada a imagem em Sistema de Fotodocumentação.

3.5.4 Análise filogenética

Os dados foram plotados em uma matriz de similaridade, que foi construída de acordo com a presença e ausência das bandas detectadas no gel. À presença foi adicionado valor 1 e à ausência 0, esses dados foram plotados em software NTSYS (ROLHF, 2000).

As análises estatísticas necessárias para a construção do dendrograma foram de acordo com o método da distância da matriz (análise de agrupamento) UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*) e o índice de similaridade empregado foi o de Jaccard.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização da Técnica de Extração de Proteína de Reserva

A extração química por solubilidade das proteínas de reserva do grão de arroz foi baseada nas adaptações feitas por SOUZA (1995). Inicialmente, o volume (04mL) das soluções extratoras foi reduzido à metade em relação ao método de origem, ou seja, antes as amostras tinham seus sobrenadantes separados em centrífuga com capacidade para até de oito amostras e depois em ultra centrífuga, saltando para 24 amostras por determinação, portanto, triplicando o quantidade de amostras por extração.

Após a extração da Albumina+Globulina e Prolamina, os sobrenadantes foram misturados e armazenados a -5°C , respectivamente. No entanto, para a glutelina, o primeiro sobrenadante extraído apresentou uma consistência bem amarelada e viscosa dificultando a separação das fases e inviabilizando a determinação da proteína. Então, foi necessário testar outra solução. Com base nos trabalhos realizados com proteínas de reserva em arroz de BARBA De La ROSA, PAREDES-LÓPEZ, GUÉGUEN (1992); ABUGOCH et al (2003) e VAZ et al. (2004;) foram selecionadas para teste concentrações abaixo de 0,5% de NaOH.

Nesse estudo foram utilizadas sete variedades de arroz para testar duas concentrações de 0,25% e 0,4% de NaOH utilizando o método de extração sequencial (Souza, 1996) original como testemunha. As concentrações de 0,25% e 0,4% NaOH apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) através do teste de comparação de médias Scott-Knott (Tabela 03), enquanto que para a concentração de 0,25% e a testemunha não houve diferença. Ou seja, a menor concentração de NaOH foi a que apresentou os valores satisfatórios e significativos quando comparados à solução de extração 0,4% de NaOH e, portanto, a mais indicada para a extração sequencial com base nas modificações realizadas.

Para a maioria dos trabalhos sobre a extração química das proteínas de cereais, o etanol e a solução de hidróxido de sódio são empregados como solventes principais em concentrações variadas além da necessidade de equipamentos sofisticados (NICANOR et al, 2006; THID & SOJI, 2005; VOZ et al. 2004). Convém salientar que KAMPEN (1995) ratifica que o uso desses solventes, de forma sequencial, na extração proteica, pode aumentar o rendimento para alguns tipos de matéria-prima, especificamente para cereais. A adaptação para extração sequencial em proteínas de reserva de arroz encontra-se na Figura 2.

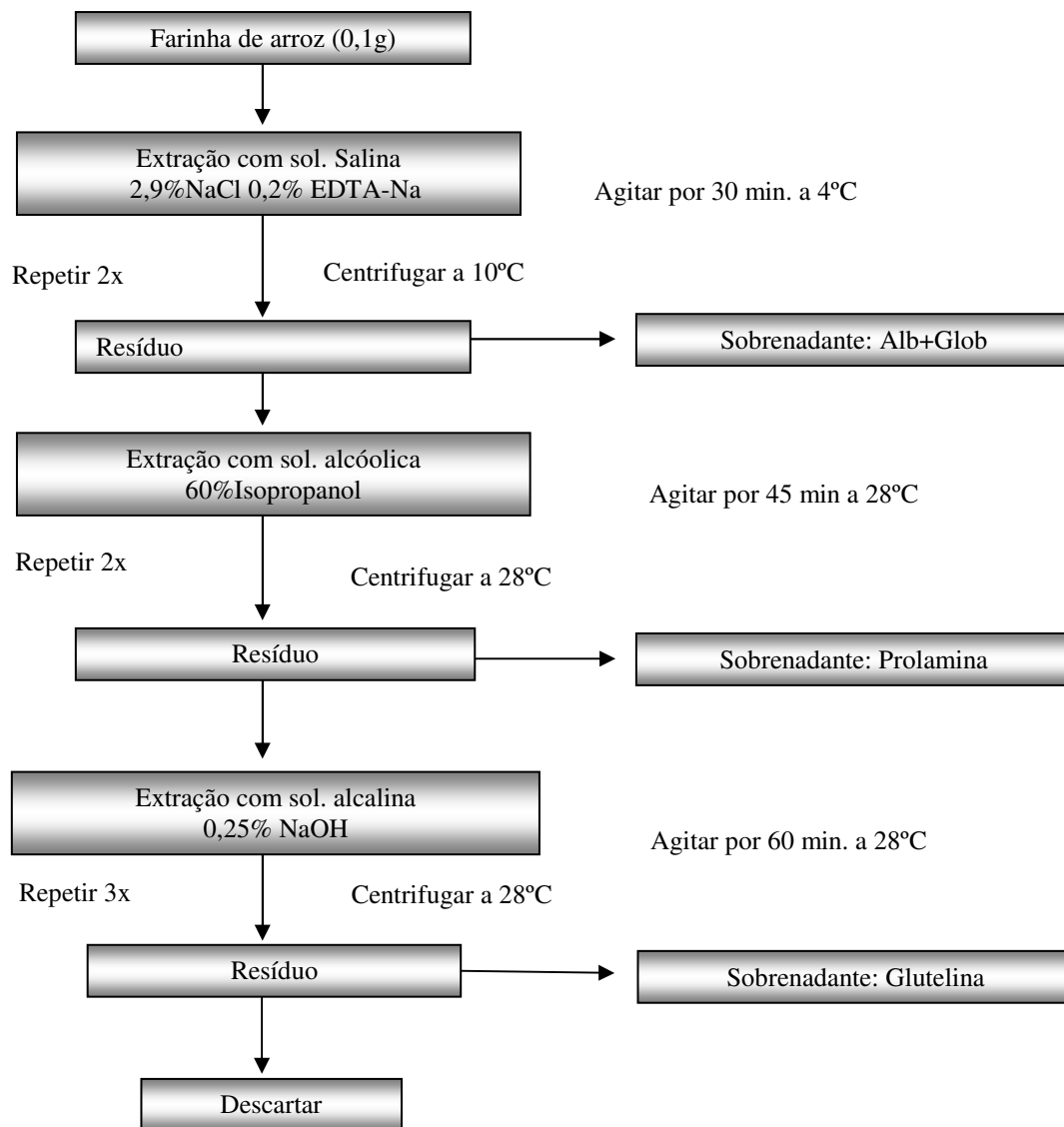


Figura 2. Esquema ilustrando a metodologia utilizada para extração sequencial de proteína de reserva em arroz.

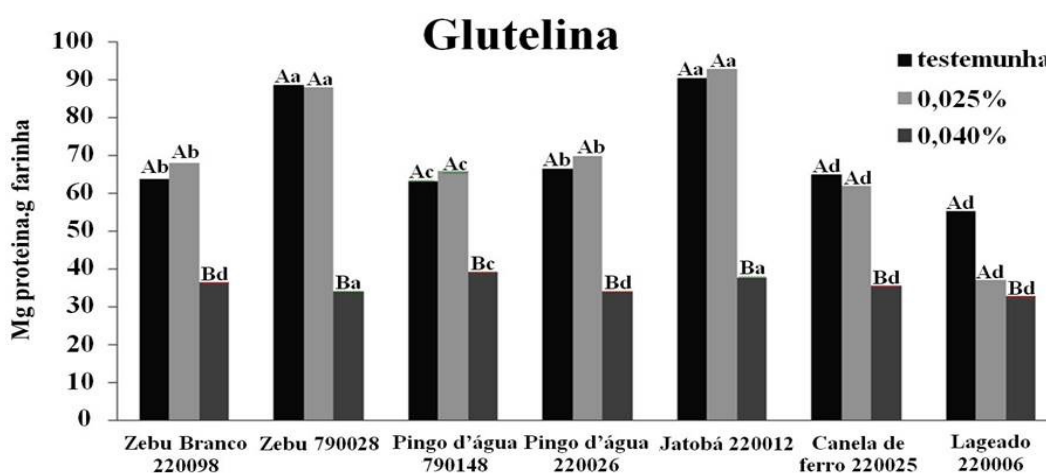
As diferenças nos valores de glutelina determinada nas contrações 0,25 e 0,4% de NaOH e também entre os genótipos testados podem ser observados na Figura 4. É importante ressaltar que o uso de apenas uma solução na extração sequencial também torna o método mais simples e econômico. Em nosso caso, foi possível simplificar, extrair e determinar em apenas um dia, no mínimo, 24 amostras por extração sequencial de proteínas de reserva em grãos de arroz. O que torna, dessa forma, viável sua caracterização em bancos de germoplasma e seleção para genótipos de interesse em programas de melhoramento genético.

Tabela 2. Análise de variância para efeito de genótipo de arroz e de concentração de 0,25 e 0,4% e Testemunha sobre a extração da glutelina (mg de farinha/mg proteína) realizados no período de Novembro de 2002 a junho de 2003. Seropédica, UFRRJ, 2006.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio
		Glutéina (mg de farinha/mg proteína)
Repetição	5	5,0672 ^{ns}
Genótipo	6	2049,75 ^{***}
Concentração	2	16270,21 ^{***}
Resíduo	100	9,4572
CV%		5,27

^{ns} não significativo, *, **, ***, significativo até 5%, 1% e a 0,1% respectivamente, pelo teste F.

Também é possível pelos resultados observar diferenças significativas entre os genótipos testados pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$). Ou seja, a facilidade do emprego desse método na rotina do laboratório permitirá que estudos sobre reposta diferencial dos genótipos às mudanças ambientais, as interações entre genótipo x ambiente, auxiliem na tomada de decisão em programas de melhoramento genético e identificação do potencial para propósitos específicos, como em nosso caso, a qualidade nutricional dos grãos.



CV = 5,27 %

Figura 3. Comparação entre as soluções de 0,25 e 0,4% NaOH para extrações de Glutelina em variedades de arroz do Maranhão. *Letras Maiúsculas não diferem significativamente entre os tratamentos e minúsculas não diferem estatisticamente entre genótipos pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

A comprovação da extração das frações das proteínas de reserva foi confirmada por meio do perfil eletroforético de uma cultivar comercial internacional cujas bandas já são conhecidas, a IR8 (Thind e Sogi, 2005), pois a técnica de SDS-PAGE é muito eficiente para

estimar a massa molecular e avaliar a pureza da molécula de proteína. Na Figura 4 é possível observar o perfil das proteínas de reserva albumina+ globulina, prolamina e glutelina para o acesso IR8 em duplicata, respectivamente. Para as proteínas albuminas+globulinas foram observadas bandas que variaram de 13 a 97 KDa. Embora tenham sido extraídas juntas, é possível diferir as bandas correspondentes às massas de cada fração.

Para as albuminas, as bandas de peso entre 18, 19 e 20KDa são indicadas pela seta 2, e em nossa extração é possível observar três bandas o que poderiam ser subunidades desse polipeptídeo, pois THIND e SOGI (2005) observaram apenas uma banda forte e 22 KDa. Já para a fração Globulina, os polipeptídios representativos no gel SDS-PAGE são indicados pelas setas 1,3,4,e 5 representando 13,8; 27,6; 43-51 e 94 KDa respectivamente, nesse caso, bastante similar ao do observado pelos autores supracitados.

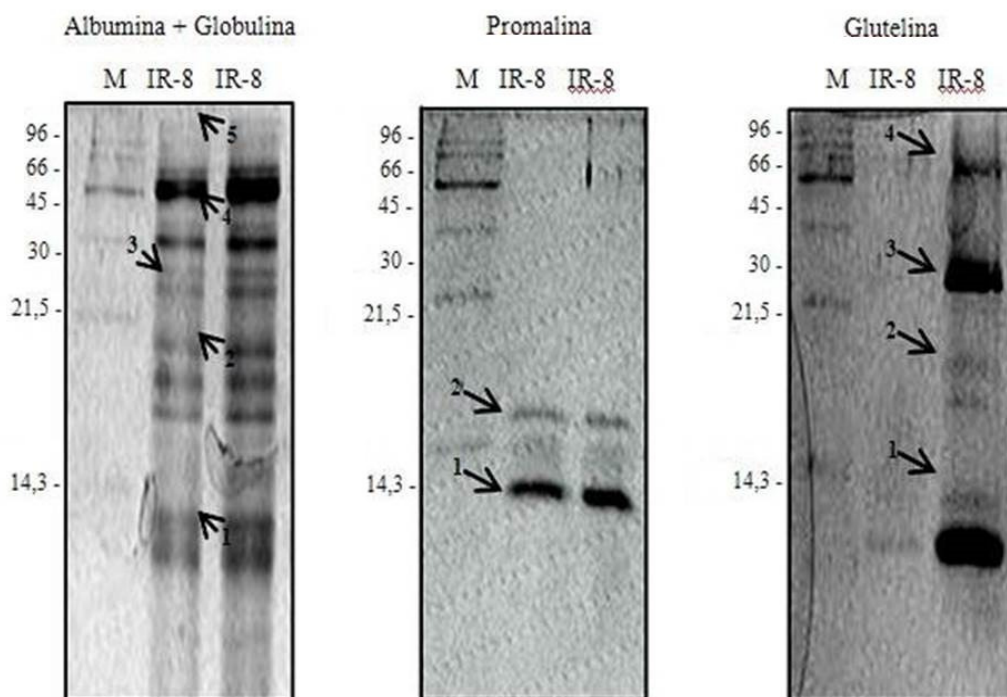


Figura 4. Eletroforese SDS-PAGE das frações proteicas: albumina+globulina, prolamina e glutelina da IR-8 e M-marcador.

A proteína de menor quantidade encontrada nas proteínas de reserva em arroz, a prolamina foi representada por bandas de baixa massa molecular de 11, 14,6 e 16 KDa respectivamente, semelhante ao observado por MANDAC e JULIANO (1979). A cultivar IR8 apresentou um perfil eletroforético para a proteína glutelina de 13,6; 19; 26 e 47 KDa de massa molecular, respectivamente destacadas pelas setas 1,2,3 e 4. A banda de 47 KDa não é comumente observada para a fração glutelina, quando as mais observadas são as α -glutelinas que formam bandas de 33 a 39 KDa. No entanto, KATSUBE e TANAKA, et al.(2004) consideraram a presença dessas glutelinas específicas à espécie *O. sativa japonica*, porém, como a cultivar IR8 serviu de base a muitas cultivares semi-anãs de arroz *indica* cultivadas nas áreas tropicais e semitropicais da Ásia, o que pode justificar a ausências dessas bandas específicas às japônicas. As bandas correspondentes à massa molecular entre 22-28 KDa correspondem β glutelina, o mesmo observado por JOHAN et al. (2001) e THIND E SOGI (2005).

4.2 Forma do Grão

A determinação das medidas do comprimento, da espessura, da largura e razão comprimento/largura apresentadas na Tabela 2.

Tabela 3. Medidas das sementes de 20 acessos de arroz: C-comprimento, E-espessura, L-largura e C/L- relação comprimento/largura e forma do grão.

Variedades	Acesso	C	E	L	C/L	Forma do grão
Bacabinha	220027	4,56	2,16	3,03	1,50	
Bacabinha	790157	5,34	2,18	3,06	1,75	
Bacaba	790098	5,38	2,15	3,04	1,77	
Pingo D'água	220026	5,24	2,08	2,87	1,82	
Bacabinha Roxo	220005	5,45	2,05	2,98	1,83	
Canela de Ferro	790164	5,40	2,07	2,91	1,86	semi-arredondada e arredondadas
Jatobá	790165	5,70	2,16	3,07	1,86	
Zebú	790028	5,47	2,18	2,93	1,87	
Zebú Branco	220028	5,78	2,12	3,08	1,88	
Canela de Ferro	220025	5,62	2,12	2,96	1,90	
Pingo D'água	790148	5,81	2,10	3,02	1,93	
Zebú Branco	220004	5,83	2,12	3,02	1,93	
Jatobá	220012	5,88	2,15	2,96	2,00	
Zebú Branco	220017	5,65	2,00	2,79	2,02	
Pingo D'água	220019	5,66	1,87	2,55	2,22	
Bacaba Comprido	220021	6,77	2,01	2,57	2,63	semi-alongada e longas
Lageado Liso	220029	6,74	1,83	2,31	2,92	
Lageado sem pêlo	220018	6,66	1,84	2,28	2,93	
Lageado	220006	6,63	1,79	2,25	2,95	
Lageado	790001	6,80	1,88	2,30	2,95	

As variedades locais foram em geral (60%) classificadas de acordo com o SNPC (1997) em semi-arredondas e arredondas, destacando-se a Bacabinha (220027) com menor relação C/L de 1,5. Para o grupo formado das semi-alongadas e longas, as variedades Lageado (2200026 e 790001) apresentaram valores superiores às demais com razão C/L de 2,95, respectivamente. A observação de caracteres não melhorados, o uso e consumo de variedades locais de grãos curtos e arredondados são preservados até hoje em algumas regiões do Maranhão, que pode estar associado à agricultura de subsistência, ausência de tecnologia para a cultura, ou ainda ambos. Pois, a razão C/L é uma dos principais caracteres levados em consideração para agregar valor, em que os grãos longos e finos são comumente mais preferidos e consumidos no ocidente e, portanto, maior valor comercial.

4.3 Proteína Bruta (%PB)

No Experimento I (Agosto) as médias das temperaturas foram para a máxima de 32° C e mínima de 23°C enquanto no Experimento II (início novembro) a média foi de 42°C para a temperatura máxima e mínima de 24° C. Dos grãos colhidos no Experimento I, apenas 17 variedades chegaram à produção, nesse sentido, foram excluídos os resultados de proteína bruta e proteínas de reserva para as variedades Lageado (790001), Lageado sem pêlo (220018) e Lageado liso (220029) nas análises estatísticas.

Tabela 4. Análise de variância para efeito de genótipo de arroz e de temperatura sobre a extração da proteína bruta (PB) realizados no período de Experimento I Ago/2002 e Experimento II Nov/2002 em 17 variedades de arroz.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio Proteína Bruta (%)
Genótipo	16	3,36***
Temperatura	1	7,12***
Repetição	3	0,05 ^{ns}
Genótipo x Temperatura	16	2,49***
Resíduo	99	0,37
CV%		6,04

^{ns} não significativo, *, **, ***, significativo até 5%, 1% e a 0,1% respectivamente, pelo teste F.

Para o teor de PB foram observadas diferenças entre as variedades de arroz estudadas nos dois experimentos realizados pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,01$), onde o Experimento I foi significativamente superior em relação ao Experimento II. No Experimento I, houve uma pequena variação de 8,27 a 11,03% (2,76%), no grupo das 17 variedades de arroz analisadas. Podendo-se destacar as variedades que apresentaram o maior e menor teor de PB, a variedade Pingo d'água (790148) com 11,03% e Jatobá (220012), com 8,27%. Ambas com formas de grãos semi-arredondadas e semi-alongadas, respectivamente (Tabela 5). Esse aumento na PB em período de temperaturas elevadas também foi observado por BEZIN & LANE (1986), eles verificaram que o efeito do aumento de 1°C nas temperaturas médias no período de quatro semanas após antese, durante 17 anos aumentou o teor de PB do grão do trigo em 0,07%.

No Experimento II, a variação de PB entre as 17 variedades também foi baixa (2,98%), a variedade Lageado (220006) obteve os menores valores: 8,56% e 8,51% nos dois experimentos, enquanto a variedade Bacabinha roxo (220005) médias superiores nos dois experimentos, com 10,39 e 11,39%.(Tabela 4).

As variedades Pingo d'água (220019) e Jatobá (220012) expressaram PB em maior quantidade no experimento II, no entanto, no Experimento I, os menores valores com 8,38% e 8,27% respectivamente.

Isso pode ter ocorrido pelo fato do Experimento II ter apresentado uma média de temperaturas mais elevadas, principalmente próximo ao período de enchimento de grãos em que as temperaturas máximas alcançaram uma média de 46°C e as mínimas de 36°C em casa de vegetação (Figura 5). Segundo Vergara (1980), temperaturas médias em torno de 35 a 45°C durante o período de formação da panícula podem reduzir o número de espiguetas e degenerar as espiguetas formadas e quando ocorrem durante a floração são ainda mais prejudiciais por causar alto número de espiguetas estéreis. Tal fato pode explicar o que foi observado para as variedades "Lageado" no Experimento I que não tiveram produção (Figura

5). Segundo GRIST (1975) as variedades de ciclo longo são mais sensíveis ao fotoperíodo que as de ciclo curto, este autor também relata que a sensibilidade ao fotoperíodo é mais freqüente em variedades do grupo *indica*, que no nosso caso contempla as variedades “Lageado”.

Tabela 5. Proteína Bruta (%PB): efeito do genótipo e Experimento I, no período de Ago-2002 a Mar-2003 e Experimento II Nov-2002 Jun-2003 nas 17 variedades de arroz. Seropédica, UFRRJ, 2006.

Variedades	Proteína Bruta (%PB)	
	Experimento I	Experimento II
Bacaba - 790098	10,25 bB	11,03 aA
Bacaba comprido - 220021	9,39 cB	10,28 bA
Bacabinha - 790157	9,90 bB	8,73 dA
Bacabinha - 220027	10,62 aB	10,87 aA
Bacabinha roxo - 220005	10,31 bB	11,39 aA
Canela de ferro - 220025	11,02 aB	10,34 bA
Canela de ferro - 790164	9,96 bB	9,98 bA
Jatobá - 790165	9,14 cB	9,72 cA
Jatobá -220012	8,27 Db	11,13 aA
Lageado -220006	8,86 cB	8,51 dA
Pingo d'água - 220026	10,79 aB	10,57 bA
Pingo d'água - 790148	11,03 aB	10,41 bA
Pingo d'água -220019	8,38 dB	11,32 aA
Zebu – 790028	10,19 bB	11,23 aA
Zebu Branco -220017	10,50 aB	10,38 bA
Zebu Branco -220028	10,89 aB	10,94 aA
Zebu Branco-220004	9,87 bB	10,33 bA
CV%	6,04	

*Letras minúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si e Maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre os experimentos I e II pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Sob altas temperaturas, o nível de deposição de amido nos grãos é acelerado, mas a redução da duração do período do enchimento do grão e o aumento da atividade respiratória diminuem a deposição de amido nos grãos. A deposição de proteína parece não ser afetada na mesma proporção, logo há um aumento da concentração da PB (CHOWDHURY & WARDLAW, 1978).

Também foi observada uma correlação inversamente proporcional na razão C/L grão a composição protéica das variedades estudadas (Figura 5).

Em estudos com QTL, TAN et al. (2001) verificaram que a localização do gene *Waxy* (que também é responsável pelo teor de PB) nos cromossomos 3 e 5 é a mesma para as características de largura e comprimento do grão o que pode explicar essa correlação, pois dependendo da distancia eles podem estar sujeitos à recombinação.

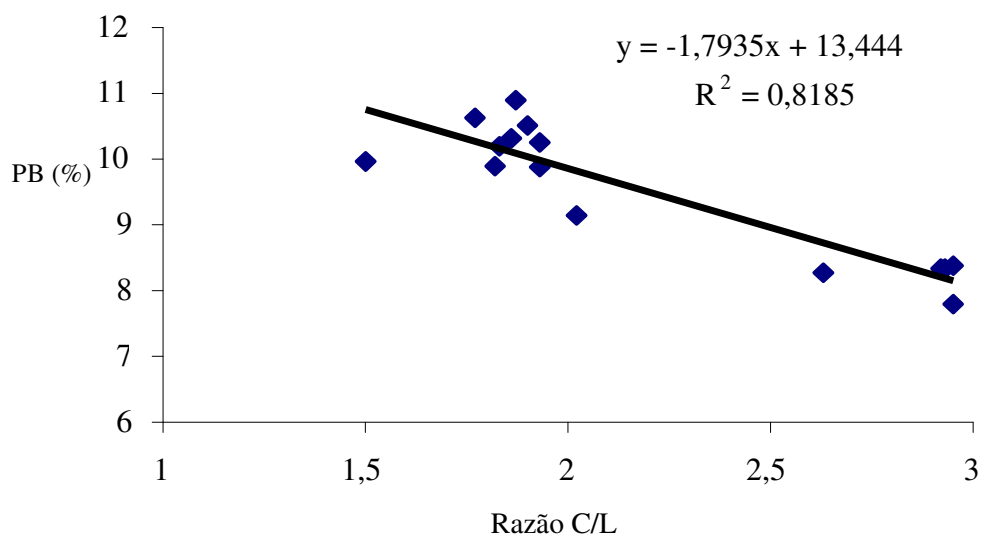


Figura 5 Relação entre a média do teor de PB e razão C/L no grão de arroz em 17 variedades de arroz.

KWARTENG et al. (2003) ao compararem características físicas, químicas e nutritivas entre variedades melhoradas e locais observaram que as variedades melhoradas possuem um grão do tipo longo e razão comprimento largura de 3,12 (média das dez variedades analisadas), uma boa aparência do endosperma, alto teor de amilose. No entanto, os valores correspondentes às características nutritivas foram superiores para as variedades locais (menor razão C/L) como: PB, menor quebra dos grãos e maior teor de Ca e K. O mesmo foi observado em nosso trabalho para PB.

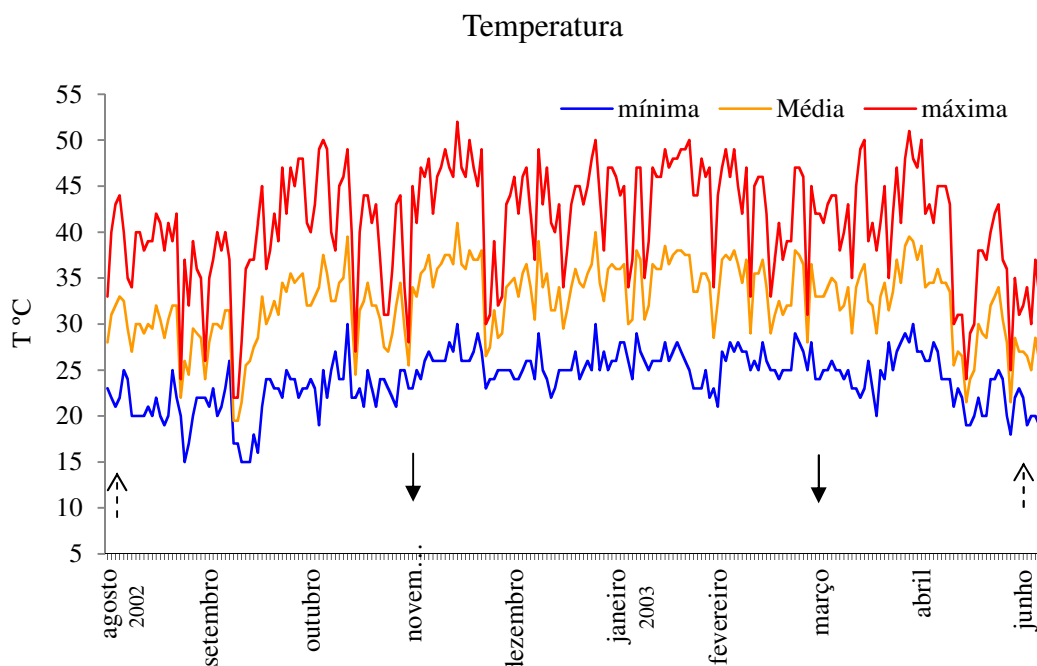


Figura 6. Temperaturas diárias no interior da casa de vegetação, durante o período experimental. Setas para cima indicam a época do Experimento I e setas para baixo, o Experimento II.

TRIBOI et al. (2002) estudando a interferência de fatores ambientais na composição das frações proteicas no grão de trigo, observaram que o teor de PB aumentou de 8,9 para 13,8% devido às temperaturas mais elevadas no período após a antese.

4.4 Extração Sequencial das Proteínas de Reserva

De acordo com a análise de variância as frações determinadas quantitativamente Albumina e Globulina, Prolamina e Glutelina apresentaram diferenças significativas pelo teste de médias Scott-Knott ($p \leq 0,001$). Porém, entre os experimentos I e II somente as frações Albuminas+Globulinas e Glutelinas apresentaram diferenças significativas (Tabela 5).

Tabela 6. Análise de variância das frações das proteínas de reserva: Albumina + Globulina, Prolamina e Glutelina. Efeito do genótipo e Experimento I (Ago-2002) e Experimento II (Nov-2002) nas 17 variedades de arroz.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio		
		Albumina+Globulina (mg de farinha/mg prot.)	Prolamina (mg de farinha/mg prot.)	Glutelina (mg de farinha/mg prot.)
Genótipo	16	10,83***	0,40 ^{ns}	976,44***
Temperatura	1	264,77***	0,61 ^{ns}	2181,60***
Repetição	3	76,28***	7,73***	29,00 ^{ns}
Genótipo x Temp	16	18,97***	0,59 ^{ns}	256,51***
Resíduo	99	3,00	0,45	30,12
CV%		7,79	15,47	7,60

^{ns} não significativo, *, **, ***, significativo até 5%, 1% e a 0,1% respectivamente, pelo teste F.

4.4.1 Albumina + globulina

No Experimento I, os teores de albumina + globulina variaram de 21,56 a 26,63 mg de proteína/g farinha, para as variedades Bacabinha (220025) Zebu Branco (220028), respectivamente. Enquanto no experimento II, o teor de albumina+globulina variou de 16,79 a 25,23 mg proteína/g farinha para as variedades Lageado (220018) e Jatobá (220012), respectivamente (Tabela 5).

Para as variedades de grãos arredondados (Tabela 3) é possível observar uma variação entre as variedades nos dois experimentos realizados, destacando-se a variedade Bacabinha roxo (220005) com 26,63 mg de far/mg prot. no Experimento I e 18,05 mg de far/mg prot. no Experimento II. A variedade Lageado (220006) foi a que apresentou o menor valor para estas proteínas em ambos os Experimentos com 21,92 e 16,79 mg de far/mg prot., respectivamente.

Comparando os teores de albumina+globulina determinados nos dois experimentos, é significativo o decréscimo dessas proteínas no Experimento II, isso, provavelmente pelas temperaturas mais elevadas registradas. Essas proteínas estruturais são acumuladas principalmente durante a divisão celular, não respondem a tratamentos com doses elevadas de nitrogênio e requer mais energia para a sua síntese, pois são compostas por aminoácidos essenciais (SOUZA 1993), justificando os valores 11,8% mas baixos que no Experimento I.

Tabela 7. Albumina e Globulina: efeito do genótipo e Experimento I, no período de Ago-2002 a Mar-2003e Experimento II Nov-2002 Jun-2003 nas 17 variedades de arroz. Seropédica, UFRRJ, 2006.

Variedades	Albumina+ Globulina (mg de farinha/mg prot.)	
	Experimento I	Experimento II
Bacaba - 790098	22,61 bA	21,48 bB
Bacaba comprido - 220021	21,80 bA	23,44 Ab
Bacabinha - 790157	23,49 bA	20,53 bB
Bacabinha - 220027	22,68 bA	22,74 aB
Bacabinha roxo - 220005	26,63 aA	18,05 cB
Canela de ferro - 220025	25,25 aA	19,74 bB
Canela de ferro - 790164	25,71 aA	22,13 bB
Jatobá - 790165	25,99 aA	20,85 bB
Jatobá -220012	21,55 bA	25,23 aB
Lageado -220006	21,92 bA	16,79 cB
Pingo d'água - 220026	26,36 aA	20,36 bB
Pingo d'água - 790148	23,32 bA	17,99 cB
Pingo d'água -220019	23,06 bA	22,30 bB
Zebu - 790028	22,35 bA	18,51 cB
Zebu Branco -220017	22,95 bA	21,58 bB
Zebu Branco -220028	22,82 bA	21,68 bB
Zebu Branco-220004	23,58 bA	21,24 bB
CV%	7,79	

*Letras minúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si e Maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre os experimentos I e II pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Cinco das 17 variedades foram superiores significativamente no Experimento I: Bacabinha roxo (220005), Pingo d'água (220026), Jatobá (790165) e Canela de Ferro (790164; 220025) enquanto no Experimento II somente três: Bacabinha (220027), Bacaba Comprido (220021) e Jatobá (220012). Mas, convém salientar que a variedade Bacabinha roxo (220005) foi superior no Experimento I, mas, inferior no Experimento II, enquanto a variedade Jatobá (220012) foi inferior no Experimento I e superior no Experimento II. Isso reflete a diversidade na capacidade em que variedades locais podem apresentar quando submetidas a condições de temperatura. De fato, a baixa variação das albuminas e globulinas é observada na literatura (TRIBOI, 2003).

4.4.2Prolamina

Entre os experimentos não houve diferença significativa pelo teste de Skott Knott ($p \leq 0,001$). Mas entre as variedades a diferença ocorreu no Experimento II. No Experimento I houve uma variação de 3,88 a 4,61 mg proteína/g farinha para as variedades Pingo d'água(790148) e Zebu branco (220028), respectivamente (Tabela 6). No Experimento II é possível observar uma maior variação em relação ao Experimento I de 3,85 a 5,19 mg

proteína/g farinha para as variedades Zebu branco (220004) e Zebu (220028), respectivamente. Em trabalhos com determinação de prolamina em cereais LOKHART&BEAN, (1997) relatam sua baixa variação sob diferentes condições ambientais.

Tabela 8. Prolamina: efeito do genótipo e Experimento I, no período de Ago-2002 a Mar-2003e Experimento II Nov-2002 Jun-2003 nas 17 variedades de arroz. Seropédica, UFRRJ, 2006.

Genótipo	Prolamina (mg de farinha/mg prot.)	
	Experimento I	Experimento II
Bacaba - 790098	4,32 aA	4,56 aA
Bacaba comprido - 220021	4,01 aA	4,98 aA
Bacabinha - 790157	4,32 aA	4,35 bA
Bacabinha - 220027	4,36 aA	3,99 bA
Bacabinha roxo - 220005	4,31 aA	4,25 bA
Canela de ferro - 220025	4,60 aA	4,07 bA
Canela de ferro - 790164	4,22 aA	3,91 bA
Jatobá - 790165	4,14 aA	4,61 aA
Jatobá -220012	4,32 aA	4,54 aA
Lageado -220006	4,21 aA	5,12 aA
Pingo d'água - 220026	4,49 aA	4,91 aA
Pingo d'água - 790148	3,88 aA	4,46 aA
Pingo d'água -220019	4,60 aA	3,87 bA
Zebu - 790028	3,91 aA	4,70 aA
Zebu Branco -220017	4,35 aA	3,94 bA
Zebu Branco -220028	4,61 aA	5,19 aA
Zebu Branco-220004	4,39 aA	3,85 bA
CV%	15,47	

*Letras minúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si e Maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre os experimentos I e II pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Ao estudar duas variedades de arroz em épocas distintas com diferentes épocas de aplicação, SOUZA (1996) observou que o teor de prolamina foi mais elevado no experimento realizado com temperatura máxima de 37,6°C e mínima de 26,5°C. Semelhante ao observados em nosso trabalho, pois, ocorreu um aumento dessa proteína no Experimento II, que teve uma temperatura máxima 42°C e mínima de 24°C. Para essa fração proteica, a variedade Lageado (220026) apresentou uma média maior desta proteína. Tal comportamento pode ser explicado pelo fato destas variedades pertencerem ao grupo Indica, e de acordo com estudos de HIBINO et al. (1989) estudando a composição de prolamina em arroz, as variedades do grupo Japônica possuem cerca de 20% de prolamina no grão enquanto as do grupo Indica cerca de 30%. Baseada nessa informação e nos resultados obtidos fez-se uma correlação entre a relação

comprimento/largura e o teor de prolamina no grão de arroz utilizando as cinco variedades com maior e menor relação. Na Figura 9, é possível observar uma correlação significativa, o que corrobora com os resultados observados por HIBINO et al. (1989).

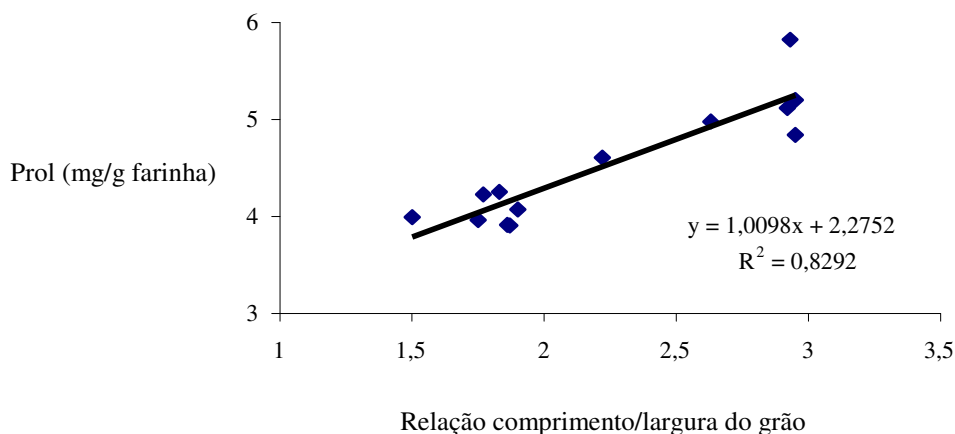


Figura 7. Correlação entre teor de prolamina e relação comprimento /largura no grão de arroz em 17 variedades locais de arroz do Maranhão.

4.4.3 Glutelina

A principal fração proteica de reserva do arroz, a glutelina, teve sua expressão variável nos Experimento I e II e também diferindo significativamente pelo teste de Skott-Knott ($p \leq 0,001$) entre as variedades. No Experimento I a variação foi de 50,7 a 92,33 mg proteína/g farinha para as variedades Lageado (22006) e Jatobá (220012), respectivamente (Tabela 7). As variedades tiveram os valores de glutelina com média foi de 76,24 e 68,23mg proteína/g farinha, nos Experimento I e II respectivamente. Foi uma variação de 10,5% entre os tratamentos. A variação entre as variedades também foi maior, no Experimento I a variedade Jatobá (220012) e Lageado (22006) apresentaram uma diferença de 47,5%, conclui-se então que a expressão da glutelina foi a que mais sofre com às condições de temperatura e efeito do genótipo entre as frações de reserva albumina+globulina e prolamina.

No Experimento II, as variedades Zebu (790028) e Zebu branco (220017) foram as que tiveram valores superiores das 17 analisadas. A variedade Bacaba (790098) foi a que mais sofreu variação, no Experimento I com 90,71e Experimento II com 63,87mg proteína/g farinha, respectivamente, ou seja uma redução de 29,58%.

O decréscimo da glutelina para as variedades com maior razão C/L no grão é observado, até porque as maiorias das variedades que apresentou os maiores teores de proteína bruta, conseqüentemente, apresentaram como a principal proteína de reserva, a glutelina. Na Figura 8, observa-se a correlação positiva encontrada entre o teor de glutelina e percentagem de proteína bruta em arroz, o mesmo foi observado por ARAÚJO (2002) e SOUZA (1990).

Tabela 9. Glutelina: efeito do genótipo e Experimento I, no período de Ago-2002 a Mar-2003 e Experimento II Nov-2002 Jun-2003 nas 17 variedades de arroz. Seropédica, UFRRJ, 2006.

Variedades	Glutelina (mg de farinha/mg prot.)	
	Experimento I	Experimento II
Bacaba - 790098	90,71 aA	63,87 cB
Bacaba comprido - 220021	71,69 bA	72,02 bB
Bacabinha - 790157	72,87 aA	42,99 dB
Bacabinha - 220027	81,82 bA	73,69 bB
Bacabinha roxo - 220005	76,58 bA	72,06 bB
Canela de ferro - 220025	68,43 cA	61,43 cB
Canela de ferro - 790164	56,87 dA	53,63 cB
Jatobá - 790165	79,01 bA	67,46 Bb
Jatobá -220012	92,32 aA	92,86 aB
Lageado -220006	50,70 dA	46,93 dB
Pingo d'água - 220026	83,38 aA	71,69 bB
Pingo d'água - 790148	85,82 aA	65,95 bB
Pingo d'água -220019	88,41 aA	83,73 aB
Zebu - 790028	77,64 bA	87,81 aB
Zebu Branco -220017	62,33 cA	71,77 bB
Zebu Branco -220028	76,72 bA	73,06 bB
Zebu Branco-220004	80,80 bA	58,97 cB
CV%	7,60	

*Letras minúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si e Maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre os experimentos I e II pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Estes autores ainda concluíram que a determinação de PB pelo método simplificado de N-Kjadhál já é suficiente para a avaliação do valor nutritivo da proteína do grão de arroz. Dessa forma, os resultados encontrados demonstram que o aumento de PB é acompanhado pelo aumento da glutelina, ou seja, o teor de PB pode ser uma forma de avaliação para a qualidade nutricional do arroz. O entendimento sobre a herança genética de controle do teor de proteína ainda não é claro sobre o controle do teor da glutelina. Por isso, o estudo desta proteína no arroz, não é importante apenas para o entendimento da expressão do seu gene, mas também para o aumento do valor nutricional da proteína no grão que serve de alimento (KIM & WU, 1990).

Os valores das frações de proteínas de reserva observados por Taira (1995) e Sgarbiere (1996) para *Oryza sativa*. Bem como as variações de albumina de 5 a 17% e globulina de 4 a 12%, prolamina de 2 a 5% e glutelina de 73 a 86% são semelhantes aos reportados em nosso trabalho.

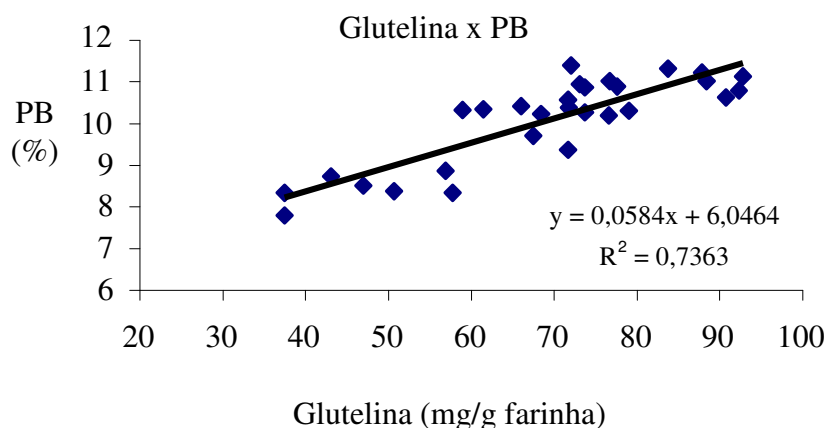


Figura 8. Relação entre percentagem de Proteína Bruta e Teor de glutelina (mg/g de farinha) no grão de arroz em 17 variedades locais de arroz do Maranhão.

Apesar de haver trabalhos de caracterização das frações de proteínas de reserva em arroz na literatura, ainda não existem estudos mais consistentes sobre o efeito do genótipo sobre determinadas condições ambientais, como temperatura e disponibilidade de água, por exemplo. Como observados em nossos resultados, a temperatura pode influenciar na expressão das frações de forma variável, ou seja, o conhecimento da expressão das espécies sob determinadas condições nos sugere manejo e seleção para otimizar sua produção e aumentar, dessa forma a qualidade nutricional.

4.5 Caracterização Molecular em Grãos Utilizando RAPD

Devido à quantidade de DNA obtida a partir da metade do embrião da semente ser limitada (20 mg), a necessidade de uma metodologia mais adequada para tal condição exigiu vários testes. Dos protocolos testados, o mais simples e eficiente para os nossos objetivos foi o **Protocolo 3** baseado em BENITO et al. (1993) e KRISHNA & JAWALI (1997). Pois, conseguimos um DNA extraído sem contaminantes, boa reprodutibilidade, consistência, simplicidade e muito indicado para trabalho com grande número de amostras (Figura 12), também realizamos um teste com tecido do embrião extraído da semente de milho apenas para observação.

Devido à baixa concentração, as bandas são fracas e nem sempre é possível ter uma imagem com boa resolução, por isso a maioria dos trabalhos exibe imagens do DNA já amplificado (McCARTHY et al., 1996; McDONALD et al., 1994).

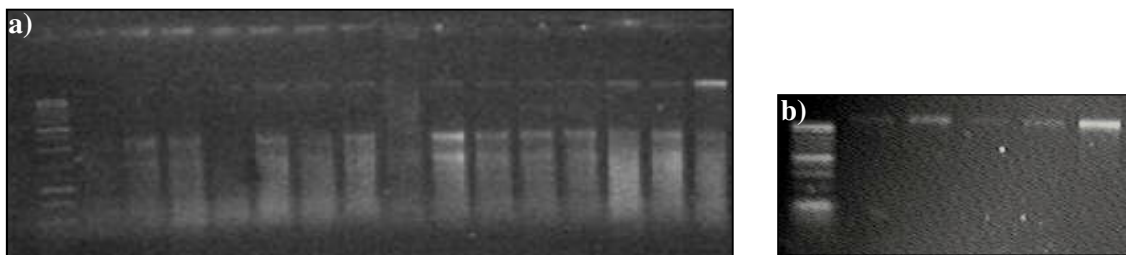


Figura 9. Extração de DNA com duas amostras em sete repetições. a) DNA extraído, b) DNA tratado com RNase.

A concentração de DNA extraído da semente apresentou média de 1,0 ng/uL, evidentemente quando comparada à extração de tecido foliar que pode atingir até 8ng/u é bem

menor. No entanto, o suficiente para realizar mais de 50 reações baseadas na PCR como RAPD e microsatélites, que utilizam aproximadamente 10-20ng de DNA.

A técnica de RAPD adaptada por ARAÚJO et al. (2003) foi realizada com sucesso sem necessitar de nenhuma adaptação. Os iniciadores utilizados também foram os mesmos utilizados pelo autor e AREIAS (2004): A02, A03, A04, A10 e A18.

O número total de bandas polimórficas ficou em torno de 37, cerca de duas a mais que o encontrado por AREIAS (2004). A extração do DNA com embrião do milho também foi eficaz, o que possibilita o uso desse protocolo para outros cereais. O tamanho dos fragmentos variou de 350 a 13000 pb. O número de bandas formado em cada reação de amplificação independe do tamanho do genoma analisado (WILLIAMS et al., 1993), sendo os iniciadores A04 e A02 (Figura 13) os que geraram um maior número de produtos de amplificação.

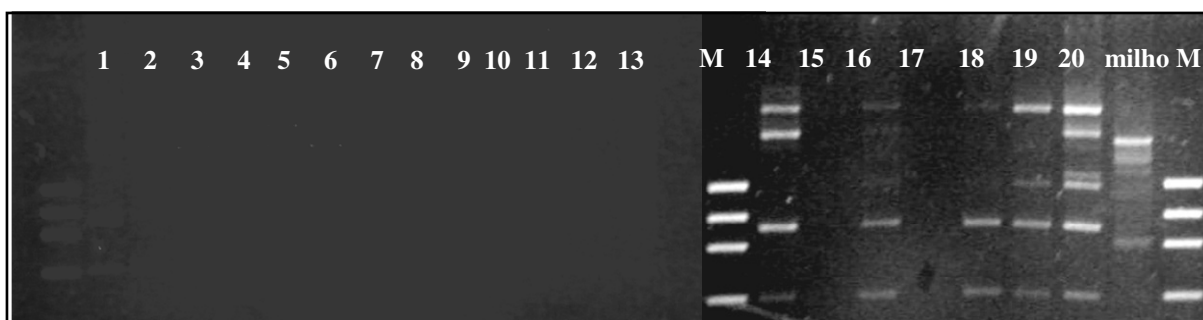


Figura 10. RAPD utilizando o primer OPA-04 com 20 variedades de arroz e milho (teste). A letra M representa o marcador \emptyset 174.

A natureza do polimorfismo da RAPD depende dos tipos de iniciadores utilizados e seus produtos de amplificação. Quanto maior for esse número, maiores serão as chances de se detectar polimorfismo e conseqüentemente os resultados serão mais confiáveis.

Embora, algumas variedades tenham apresentado uma diferença na amplificação. O perfil dos produtos de amplificados foi semelhante aos produtos de amplificação encontrados no foliar e embrião da semente (Figura 11a e 11b).

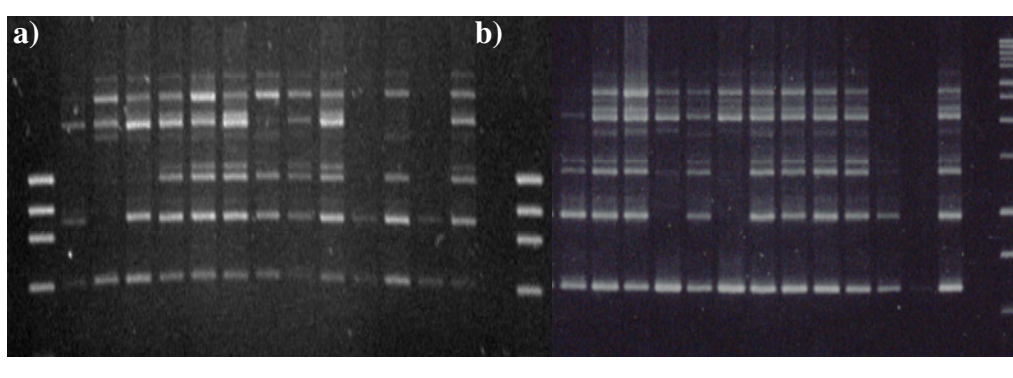


Figura 11. Amplificação de DNA de algumas variedades de arroz com o primer OPA 02. a) DNA extraído do embrião de arroz e b) DNA extraído de folha de arroz.

4.5.1 Construção do dendrograma

No dendrograma (Figura 12) para o nível de 55% de similaridade é possível observar a formação de grupos de variedades de mesmo nome próximas entre si como as do grupo

“Lageado” e “Zebu branco” que também possuem razão C/L no grão semelhante, alongadas e semi alongadas respectivamente. No agrupamento das variedades Pingo d’água (220026) e Bacaba comprido (220021) e o isolamento de Pingo d’água (220019) foram iguais nos dois dendrogramas. O agrupamento das variedades com DNA extraído com tecido do embrião da semente teve uma maior homogeneidade entre as variedades oriundas da Baixada Maranhense (identidade do acesso iniciada por 22). O encontro de correlações entre morfologia, fisiologia, locais de origem, com os marcadores genéticos é desejável, uma vez que tais correlações ajudam a entender melhor os agrupamentos.

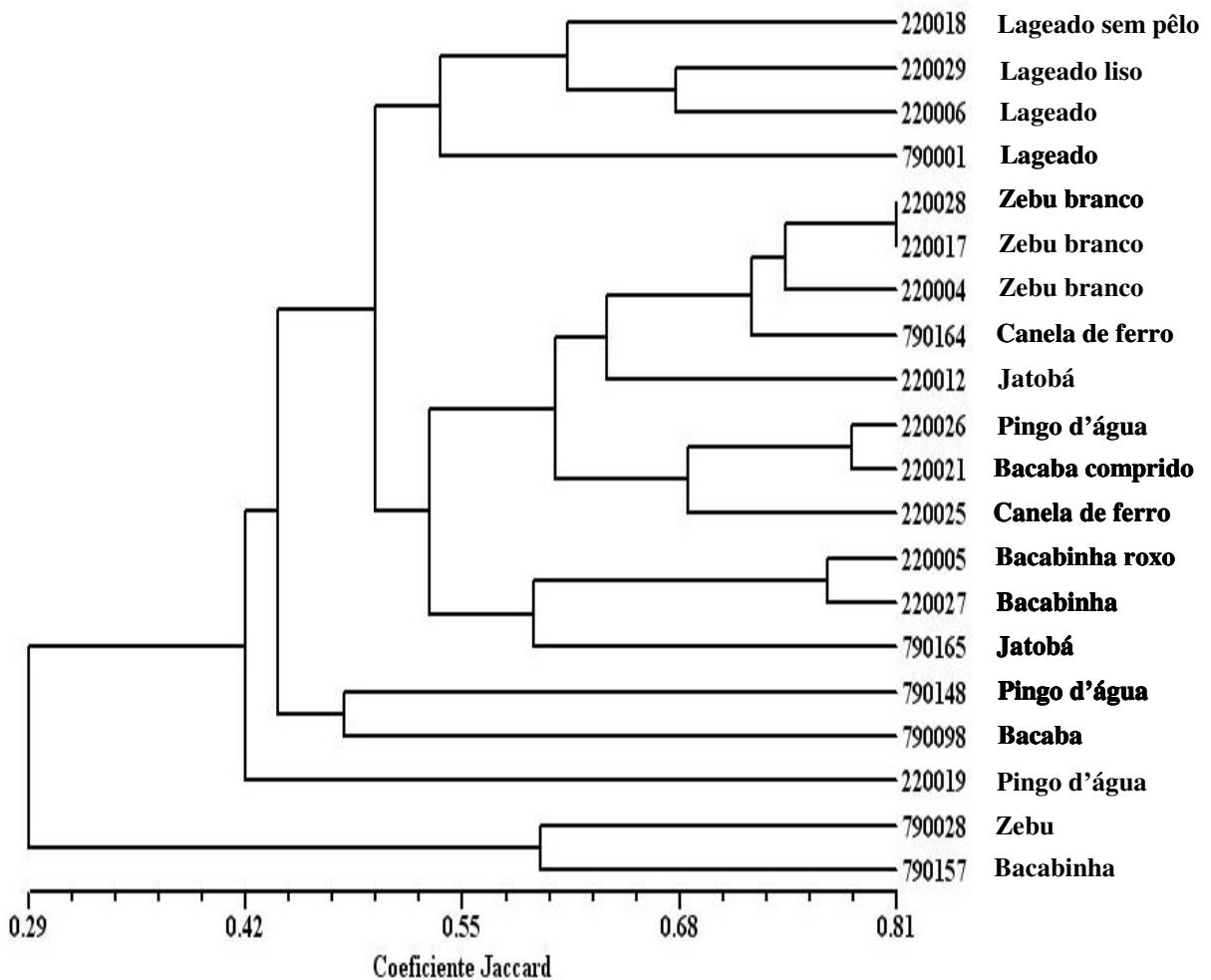


Figura 12. Dendrograma de similaridade genética a partir dos produtos amplificados do DNA por RAPD de 20 acessos locais de arroz do Maranhão.

Vários trabalhos com a RAPD já foram realizados com intuito de separar acessos por locais de origem de distintas condições edafoclimáticas. GE et al. (1999), conseguiram verificar a diversidade e diferença genética entre populações de arroz selvagem cultivado no Brasil e na China. COLOMBO et.al. (2000) constataram que o fato de não haver correlação com localidades pode ser devido a fraca estruturação genética o que pode ocasionar sobreposição de genótipos de diferentes localidades. Esse fato, ainda segundo este autor, pode ocorrer por fatores como as trocas de material botânico, entre pequenos produtores e a recombinação que pode ocorrer entre plantas.

5 CONCLUSÕES

A metodologia adaptada para extração de frações protéicas foi otimizada garantindo a simplicidade, rapidez e menor custo para extração das proteínas de reserva a proteínas de reserva no grão de arroz, favorecendo o seu emprego em programas de melhoramento visando aumento no valor nutritivo na seleção de variedades.

As proteínas de reserva tiveram baixa variabilidade quando comparados nos dois experimentos realizados. Destas, a glutelina foi a que apresentou uma maior variação, acompanhada do teor de PB, tendo um maior incremento no experimento II, provavelmente devido à temperatura mais elevada.

Observou-se que as variedades com maior razão comprimento/largura nos grãos apresentaram maiores teor de PB e maior teor de glutelina. Tal comportamento pode estar associado à proximidade de genes para expressão do teor de PB e glutelina às características morfológicas do grão razão comprimento/largura.

A extração de DNA a partir do embrião permitiu uma análise mais rápida, dispensando a germinação das sementes para análise de diversidade genética.

O dendrograma obtido a partir da extração de DNA do embrião foi semelhante ao construído a partir do tecido foliar, porém com uma melhor separação entre os locais de origem das variedades. Ou seja, para o emprego da técnica RAPD em estudos de diversidade genética deve-se considerar a fonte de DNA extraído e a melhor técnica de extração para o tecido selecionado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBOOLA, S.; DARREN, N.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science* xx 1–8. 2005.
- AKAGI, H., YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor. Appl. Genet.* 94:61–67, 1997.
- AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUGIMURA, T. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93:1071–1077, 1996.
- ALTMAN, D.W., McCUITION, W.L.; KRONTAD, W.E. Grain protein percentage, kernel harding and grain yield of winter wheat with foliar applied urea. *Agronomy Journal*, 75: 87-91, 1993.
- ARAÚJO, E. S. Diversidade genética e acúmulo de proteína de reserva em arroz da Baixada Maranhense-MA. Dissertação. 60p. UFRRJ, Seropédica, 2002.
- ARAÚJO, E.S.; SOUZA, S.R.de; FERNANDES, M.S. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1281-1288, 2003.
- AREIAS, R.G.D.B.M. Análise da divergência genética em 20 acessos de arroz do Maranhão através de marcadores morfológicos, metabólicos e moleculares. Dissertação.78p.UFRRJ, Seropédica,. 2004.
- BARBA De La ROSA, A., PAREDES-LÓPEZ, O.; GUE´GUEN, J. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 937-940, 1992.
- BEAN, S.R.; BIETZ, J.A.; LOOKHART, G.L. High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *Journal of Chromatography A* 814 (1998), pp. 25–41.
- BENITO, C.; FIGUEIRAS, A.M.; ZARAGOZA, C.; GALLEGU, F.G.; DE LA PEÑA, A. Rapid identification of triticeae genotypes from single seeds using polymerase chain reaction. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 21, p. 181-183, 1993.
- BIETZ, J.A.; LOOKHART, G.L. Wheat varietal identification by capillary electrophoresis: an inter laboratory comparison of methods. *Cereal Foods World*, v.39, p.603, 1994.
- BIETZ, J.A.; SCHMALZRIED, E. Wheat varietal identification by acidic capillary Biophys. *Acta* 1058, 107–112.
- BLIGH, H.F.J.; TILL, R.I.; JONES, C.A. A microsatellite sequence closely linked to the Waxy gene of *Oryza sativa*. *Euphytica* 86: 83–85. 1995.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331, 1980.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

CAGAMPANG, G.B.; CRUZ, L.J.; ESPIRITU, S.G.; SANTIAGO, R.G.; JULIANO, B.O. Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chemistry* 43, 145–155, 1966.

CHAPARRO, J.X.; WERNER, D.J.; O'MALLEY, D.; SEDEROFF, R.R. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.* 87:805–815, 1994.

CHEN, X.S.; TEMNYKH, X.; CHO, Y.G.; McCOUCH S.R.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S. Development of microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice *Theor. Appl. Genet.* 95:553-67, 1997.

CHO, Y.G.; ISHII, T.S.; TEMNYKH, X.; CHEN, L.; LIPOVICH, S.R.; McCOUCH, W.D.; PARK, N.A.; CARTINHO, S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:713–722, 2000.

CHOWDHURY, S.I.; WARDLAW, I.F. The effect of temperature on kernel development in cereals. *Australian Journal of Agricultural Research* 29: 205–223. 1978.

CHUNWONGSE J.; MARTIN, G.B.; TANKSLEY, S.D. Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. *Theor. Appl. Genet.* 86:694–698, 1993.

COLOMBO, C.; GERARD, S.; CHARRIER, A. Diversity within American Cassava germplasm based on RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 23: 189-199. 2000.

COOKE, R.J. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. *Electrophoresis*. *Electrophoresis*, 5:59-72, 1984.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v.19, p.299-306, 2001.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 1996. p.390.

CRUZ, L.J.; CAGAMPANG, G.B.; JULIANO, B.O. Biochemical factors affecting protein accumulation in the rice grain. *Plant Physiol.* 46:743. 1970.

DAHLBERG, J.A.; ZHANG, X.; HART, G.E.; MULLET, J.E. Comparative assessment of variation among sorghum germplasm accessions using seed morphology and RAPD measurements. *Crop Science.* 42: 291-296, 2002.

De DATTA, S.K. Nitrogen transformation processes in relation to improved cultural practices for lowland rice. *Plant and Soil*. 100:47-69, 1987.

DECKARD, E.L.; TSAI, C.Y., TUCKER, T.C. Effect of nitrogen nutrition on quality of agronomic crops. In: Hauck, R.D. (ed), *Nitrogen in crop production*. Asa, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin, USA.601-615, 1984.

DOEBLEY, J.M.; DURBIN, E.M.; GOLENBERG, M.T.; CLEGG, D.P.M. Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (rbcL) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae) *Evolution* 44:1097-1108. 1990.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant for genomic DNA PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19:1349.

EGGUM, B.O. The nutritional value of rice in comparison with other cereals. *Proceedings of the workshop on chemical aspects of rice grain quality*. IRRI , Los Baños, Philipinas, 1979.

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S.C.K., ed. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.3-15.

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

GALGARO, M.L.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A.; VALLS, J.F.M.; KOCHERT, G. Genetic variation between several species of sections Extranervosae, Caulorrhizae, Heteranthae, and Triseminatae (genus *Arachis*) estimated by DNA polymorphism. *Genome*, Ottawa, v. 41, p. 445-54, 1998.

GE, S.; OLIVEIRA, G.C.X.; SCHAAL, B.A.; GAO, L.; HONG, Y.D. RAPD variation within and between natural populations of rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*., 82: 638-44, 1999.

GOTMISKY, S.A.; KOKAEVA Z.G.; BOBROVA V.K.; Use of molecular marker for the analysis of plant genome. *Res. Journal. Genetics*. 11, (35): 1538- 49 1999.

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

HIBINO, T.; De BOER, A.D.; WEISBEEK, P.J.; TAKABE, T. HIGUCHI, M.; FUKAZAWA C. A rice glutelin and a soybean glycinin have evolved from a common ancestral gene. *Gene*, 55:245-253, 1987. 1989.

JULIANO, B.O. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. In: Juliana, B.O (Ed) *Rice: Chemistry and Technology*. St. Paul, Minnesota. Am. Assoc. of Cereal Chem., 59-175, 1985.

JUNJIAN, N.P.; COLOWIT, M.; MACKILL, D. Evaluation of genetic in rice subspecies using microsatellite markers. *Crop Science* 42:601-07, 2002.

KATSUBE-TANAKA, T., J.B.A. DULDULAO, Y. KIMURA, S. IIDA, T. YAMAGUCHI, J. NAKANO, S. UTSUMI. The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. *Biochemica et Biophysica Acta.*, 1699: 95-102, 2004.

KAMPEN, W. H. Charlotte, NC. Recovery of protein isolate and/or starch from cereal grains. United States Patentn. 5.410.021, apr. 25,1995.

KIM, Y.S.; WU, R. Multiple protein factors bind to a rice glutelin promoter region. *Nucleic Acids Research*, 23(18), 6845-6852, 1990.

KOKAEVA, Z.G.; BOBROVA, V.K.; PETROVA, T.V. Genetic polymorphism of pea varieties, lines, and mutant revealed by RAPD analysis, *Genetika (Moscow)*, 34(6): 771-777, 1998.

KRISHNA, T.G; JAWALI, N. DNA isolation from single or half seeds suitable for random amplified polymorphic DNA analyses. *Analytical Biochemistry*, 250: 125-127, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.

LÁSZTITY, R. *The Chemistry of Cereal Proteins*, second ed. CRC. Press, Boca Raton, 1996.
LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44:397-401, 1989.

LOOKHART, G.L.;BEAN, S. Rapid identification of oat cultivars and of rice cultivars by capillary zone electrophoresis. *Cereal Chemistry* 72,312–318, 1995.

MACKILL, D.J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers *Crop Sci* 35: 889 – 894, 1995.

MCCARTHY, P.L.; HANSEN J.L.; ZEMETRA, R.S.; BERGER P.H. Rapid Identification of Transformed Wheat Using a Half-Seed PCR. *Assay.BioTechniques* .32:560-564, 2002.

MCDONALD, M.D.; ELLIOT, L.J.; SWEENEY, P.A. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed Science and Technology*, Zürich. v.22, n.1, p.171-176, 1994.

MOLINARI, H.B.; CROCHEMORE, M.L. Genomic DNA extraction from *Passiflora* spp. for PCR-RAPD analyses. *Rev. Bras. Frutic.*, Aug. 2001, vol.23, no.2, p.447-450.

NEYRA, C.A.; PEREIRA, P.A.; BALDANI, J.I. Efficiency of nitrogen utilization by the maize plant. In: *Workshop on maize breeding and maize production*. Euromiza 88, Belgrade, Yugoslávia, 1988.

NICANOR, A.B.; SCILINGO. A.; ORTYZ, M.C.G. Guava seed storage protein: Fractionation and characterization. *Food Science and Tecnology*, v.39, n.08, outubro, p.902-91. 2006.

OSBORNE, T. B. *The vegetable proteins* (2nd ed). New York: Longmans, Green and Company, 1924.

PANAUD, O. CHEN, S.R. McCOUCH R.S. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa*). *Mol Gen Genet.*, 252: 597-607, 1996.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993, 1993.

PEMBERTON, J.M., SLATE, J., BANCROFT, D.R., BARRET, J.A. Non amplifying alleles at microsatellite loci – a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4. 249-52, 1995.

REDOÑA, E.D.; MACKILL, D.J. Quantitative trait locus analysis for rice panicle and grain characteristics. *Theor. Appl. Genet.* 96:957–963, 1998.

ROHLF, J.F.; NTSYS – pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis System. Version 2.1. Setauket. NY: Exeter Software, 2000. 38p.

SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Laboratory, 1989. v.9, p.16-23.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: DeSALLE, R.; SCHIERWATER, B. eds. *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*, Basel, Switzerland, p.71-86,1998.

SHAPIRO, A.L.;VIÑUELA, E.; MAIZEL, J.V.JR. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 7;28(5):815-20. 1967.

SILVA, A.T. Estudo da divergência genética em acessos de arroz através de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD). Tese de Doutorado, Lavras: UFLA. 1999. 185 p.

SOUZA, S.R. Teor e qualidade das proteínas do arroz com aplicação foliar e no solo de URAN. Instituto de Agronomia. Dissertação de Mestrado, UFRRJ. 1990, 98p.

TANG, S.; HETTIARACHCHY, S.; SHELLHAMMER, T. H. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran.1.Physical processing and enzyme treatments.*J. Agric. Food Chem.*, Easton, v. 50, n. 25, p. 7444-7448, dec. 2002.

TAUTZ D.; RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucaryote genome. *Nucl Acids Res.* 12:4127-38, 1984.

TEDESCO, J.M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS-Departamento de Solos, 1995. 174p.

TEMNYKH, S.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S.; HAUCK, N.; LIPOV-VARIEICH, L.; CHO, Y.G.; ISHII, T.; and S.R. McCouch. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697–712, 2000.

THOMAS, M.R.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant. Molec. Biol.* 25, pp. 939–949.1994.

TRIBOI, E.; TRIBOI-BONDEL, A.M. Productivity and grain or seed composition: a new approach to an old problem – invited paper. Elsevier Science, *European Journal of Agronomy*16, 163-186 p. 2002.

- VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, v.137, p.63-72, 2004.
- VERMA, S.K.; KHANNA, V.; SINGH, N. Random amplified polymorphic DNA analysis of India scented basmati rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for identification of variability and duplicate accessions, if any. *Electrophoresis*, 20: 1786-89, 1999.
- VIRK, P.S. The identification of duplicate accessions within a rice germoplasm collection using RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, v.90, p.1049-1055, 1995.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* November 11; 23(21): 4407–4414. 1995.
- WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, v.214, p.4406-4412, 1969.
- WERNER, W.E.; WICTOROWICZ, J.E.; KASARDA, D.D. Wheat varietal identification by capillary electrophoresis: Gliadin and high molecular weight glutenin analyses. *Cereal Chem.* 71:397. 1994.
- WILLIAMS, J.G.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 218: 704–740. 1993.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary initiators are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, vol. 18; 5531-35, 1990.
- XAVIER, G.R. Estudo da ocupação nodular de rizóbio em diferentes genótipos de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) agrupados pela técnica de RAPD Mestrado em Agronomia (Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Brasil, 2000.
- YAMAGATA, H.; SUGIMOTO, T.; TANAKA K.; KASAI. Z. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol.* 70: 1094-1100. 1982.
- YAMAGATA, H.; TANAKA, K. The site of synthesis and accumulation of rice storage proteins. *Plant CellPhysiol.*27:135-145. 1986.
- YOKOYAMA, L.P.; RUCATTI, E.G.; KLUTHCOUSKI, J. Economia da produção: Conjuntura, mercado e custos. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. A cultura do arroz no Brasil. Santo Antônio de Goias: EMBRAPA arroz e feijão, 1999. P.36-57.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11: 1-16, 2002.
- ZHAI, C.K., TANG, W.L.; JANG, X.L.; LORENZ, K.J. Studies of the safety of Chinese wildrice. *Food Chem Toxicol* 34, pp. 347–352. 1996.