

 **PDF**
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A
VARIAÇÕES NO TEOR DE AMIOSE E TEMPERATURA DE GELATINIZAÇÃO EM
GRÃOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

LECIANE KARITA DE OLIVEIRA

Orientadora: Dr^a. Rosana Pereira Vianello Brondani

Goiânia
2009

IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A
VARIAÇÕES NO TEOR DE AMIOLOSE E TEMPERATURA DE GELATINIZAÇÃO EM
GRÂNULOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Dissertação apresentada à Coordenação
do Programa de Pós-Graduação em
Biologia, da Universidade Federal de
Goiás, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Biologia,
área de concentração Biologia Celular e
Molecular.

Orientadora: Dr^a. Rosana Pereira Vianello Brondani
Coorientador: Dr. Claudio Brondani

Goiânia
2009



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

**[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)**



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, grande guerreira e incentivadora, às minhas irmãs que são sempre carinhosas, às minhas queridas sobrinhas que me dão tanta alegria e ao meu pai que mesmo de longe sempre me aconselhou.

À toda família que sempre me ajudou.

A Deus.

À minha orientadora Dr^a. Rosana Brondani e ao Dr. Cláudio Brondani pela orientação e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos do laboratório de biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, que sempre me apoiaram.

Ao estagiário Gustavo pela ajuda na construção dos *primers*.

À Renilda pela ajuda nas análises físico-químicas.

À pesquisadora e amiga Tereza Borba, pela ajuda no desenvolvimento de todo trabalho e pelo apoio.

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO GERAL	11
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1. GÊNERO <i>Oryza</i>	12
3.2. <i>Oryza sativa</i>	12
3.3. AMIDO	14
3.3.1. Estrutura do amido.....	14
3.3.2. Amido na alimentação.....	16
3.3.3. Biossíntese do amido	17
3.3.4. Propriedades físico-químicas do amido no grão do arroz.....	18
3.4. MARCADORES MOLECULARES.....	20
3.5. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	23
3.6. MAPEAMENTO ASSOCIATIVO.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. MATERIAL VEGETAL.....	27
4.2. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO GRÃOS DO ARROZ	27
4.3. ANÁLISE GENÉTICA.....	28
4.3.1. Extração e quantificação do DNA genômico.....	28
4.3.2. Marcadores molecular	28
4.3.3. Protocolos de amplificação para os de marcadores moleculares	33
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
5. RESULTADOS.....	39
5.1. DADOS FENOTÍPICOS	39
5.2. ANÁLISE MOLECULAR.....	40
5.2.1. Análises com marcadores microssatélite.....	40
5.2.2. Análises com marcadores SNP	51
5.2.3. Análise de associação.....	59
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE	80
ANEXOS.....	95

RESUMO

OLIVEIRA, L. K. **Identificação e validação de marcadores moleculares associados a variações no teor de amilose e temperatura de gelatinização em grãos de arroz (*Oryza sativa* L.).** 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado em Biologia: Biologia Molecular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

A síntese do amido envolve vários genes que interagem em cascata. Mutações nestes genes interferem na composição final de amido e consequentemente na composição e qualidade do grão de arroz, pelo fato da composição físico-química do amido ter grande influência nas propriedades do grão. Por meio do mapeamento associativo é possível identificar genes relacionados às características quantitativas e, com isso, utilizar marcadores moleculares destes genes como ferramenta para seleção assistida em programas de melhoramento, que utilizam como base bancos de germoplasma. Este trabalho teve como principal objetivo identificar e validar a associação entre o teor de amilose (TA) e temperatura de gelatinização (TG) com marcadores moleculares microssatélites e SNP de genes envolvidos na rota metabólica do amido. No desenvolvimento do trabalho foram utilizados 242 acessos da coleção nuclear de arroz da Embrapa Arroz e Feijão, que estão classificados de acordo com sistema de cultivo sequeiro e irrigado. Os acessos também foram classificados quanto ao TA, de acordo com análise realizada em 2004 e 2005, e à TG, avaliada neste trabalho. Foi construída uma mini coleção com 24 acessos contrastando quanto ao sistema de cultivo e ao TA. Como resultado, foi observado que a maior parte dos 242 acessos possuem TG intermediária, entre 69°C e 73°C. Para a análise genética foram utilizados 36 marcadores moleculares, destes 7 estão descritos na literatura, sendo três microssatélite (SSR), 1 *Sequence Tagged Sites* (STS), 2 *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence* (CAPS) e o conjunto de pares de primers F7-F22-R1-R21. Os outros marcadores foram desenvolvidos para este trabalho no laboratório de biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, sendo que 6 marcadores são baseados em SSR e 26 em SNP. Para o conjunto de marcadores SSR foram identificados 70 alelos, com média de 8,75 alelos por loco. A diversidade genética (H_e) foi maior para os acessos com sistema de cultivo irrigado (0,72) quando comparado aos acessos com sistema de cultivo sequeiro que tiveram média igual a 0,55. Foram encontrados SNP/Indel em 10 marcadores quando a mini coleção nuclear foi sequenciada. A diversidade nucleotídica foi baixa, com valor médio de 0,0054. O marcador CA-2, do gene que expressa a enzima *Glucose-6-phosphate isomerase*, apresentou o maior número de polimorfismos, com total de 9 SNP/Indel. Com base no dendrograma de similaridade genética, construído com os dados dos locos SSR, foi possível diferenciar os acessos quanto ao sistema de cultivo e ao TA. Nove marcadores apresentaram associação significativa ($p < 0,05$) com uma das características avaliadas, sendo que seis marcadores foram associados com o TA. O marcador W2R, do gene *waxy*, foi o que mais explicou a variação de TA (82%). Para TG foi encontrada associação com 8 marcadores, sendo que o conjunto F7-F22-R1-R21 explicou melhor a variação (66%). A análise fatorial de correspondência demonstrou que o conjunto de locos SSR da literatura em conjunto com os desenvolvidos para este trabalho são eficientes em discriminar os acessos entre as classes de TA. Este trabalho possibilitou a identificação de associações não aleatórias entre locos e características do amido de interesse econômico. Validando marcadores descritos na literatura e marcadores nunca testados, abrindo novas perspectivas quanto ao uso desses marcadores na seleção precoce para TA e TG em arroz.

Palavras chave: qualidade de grão, biossíntese, amido, coleção nuclear, polimorfismo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. K. **Identification and validation of molecular markers associated with changes in amylose content and gelatinization temperature in grains of rice (*Oryza sativa* L.)**. 2009. 139 f. Dissertation (Master in Biology: Molecular Biology) ñ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

The synthesis of starch involves the interaction a complex cascade of genes. Alterations in these genes can change the final composition of starch and alter the quality of the rice grain after cooking. The quality of grain is influenced by the physico-chemical properties of starch. Through the associative mapping is possible to identify genes related to a quantitative trait and, therefore, using molecular markers of this gene as tools for assisted selection in breeding programs using access genebanks. This work had as objective identify and validate the association between amylose content (TA) and gelatinization temperature (TG) with molecular markers microsatellites and SNP of genes involved in starch metabolic route. Were used 242 accessions of rice core collection of Embrapa Arroz e Feijão, separated according to cropping system upland and lowland. The accessions were also classified for TA, based on the analysis conducted in 2004 and 2005, and TG analysis in 2007. The genetic analyzes were conducted using 36 molecular markers, 7 are those described in the literature, three microsatellite (SSR), 1 Sequence Tagged Sites (STS), 2 cleaved amplified polymorphic Sequence (CAPS) and the set of pairs of F7-F22-R1-R21 primers. The other markers were developed for this work in the Biotechnology laboratory of the Embrapa Arroz e Feijão, 6 markers are based on SSR and 26 SNP. For SSR markers were identified 70 alleles, with an average of 8.75 alleles per locus. The genetic diversity (H_e) was higher for access to lowland (0.72) compared to accesses with upland, that had a mean of 0.55. Found SNP/Indel 10 markers when the mini core collection was sequenced. The nucleotide diversity was low, with an average of 0.0054. CA-2 marker gene which expresses the enzyme glucose-6-phosphate isomerase, showed the greatest number of polymorphisms, with 9 SNP/Indel. Based on the genetic similarity dendrogram constructed with data from the SSR loci, was found genetic difference in the cropping system and the TA. Nine markers were significantly associated ($p < 0.05$) with one of the characteristics. These six markers were associated with TA. The marker W2R, the waxy gene, was the one that best explained the variation of TA (82%). Eight markers were associated with TG. The F7-F22-R1-R21 together best explained the variation (66%). The factorial correspondence analysis has shown that the set of SSR loci literature together coms developed for this work are efficient in allocating access between TA classes. This work allowed the identification of not random associations between loci and starch characteristics of economic interest. Validating markers described in the literature and new markers, opening new prospects for the use of these markers in the early selection for TA and TG in rice.

Keywords: grain quality, biosynthesis, starch, core collection, polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade do grão do arroz, como o cozimento e processamento, é influenciada principalmente por características do amido, uma vez que ele compõe 90% do total da matéria seca do grão (Juliano, 1993). O amido é um polímero formado por dois polissacarídeos, a amilose, que é formada por cadeia linear, e, a amilopectina, formada por cadeia ramificada (Wurzburg, 1986). O teor de amilose e a temperatura de gelatinização estão entre as características mais importantes do grão, por estarem relacionadas ao cozimento e consistência do grão.

Nos países em desenvolvimento o arroz tornou-se a principal fonte de nutrientes, por ser um produto acessível e pelo grande valor nutricional. O grão de arroz fornece 20% de energia e 15% de proteínas necessárias aos seres humanos (Castro et al., 1999), possui também grande quantidade de minerais e vitaminas.

Para elevar o potencial de rendimento, qualidade nutricional do grão e bom desempenho na culinária, é necessário utilizar recursos genéticos conservados. Com isso, recorrer a bancos de germoplasma para conseguir novas combinações alélicas é uma importante ferramenta para programas de melhoramento. O conhecimento dos padrões fenotípicos e genotípicos do acervo dos bancos de germoplasma permite buscar acessos desejáveis. No entanto, o grande número de acessos do banco de germoplasma pode inviabilizar a caracterização de todos os acessos, isto torna essencial o uso das coleções nucleares que possibilita avaliar a variabilidade existente em um número reduzido de acessos (Frankel, 1984; Nass, 2001). O detalhamento do perfil gênico destes acessos pode ser feito com o uso de marcadores moleculares, permitindo acessar diferenças no genoma que causam alterações de determinado fenotipo.

O estudo de regiões específicas no genoma que controlam características importantes, tornou-se mais fácil com o aumento da disponibilidade de ferramentas moleculares. Com isso, é possível aumentar a compreensão da base genética das rotas

em grande influência em características agronômicas, como a biossíntese do amido.

Uma metodologia recentemente para identificar marcadores associados à expressão de fenótipos de interesse é o mapeamento. Nesta metodologia são utilizadas informações moleculares e dado experimental de campo para determinada característica. Com o mapeamento associativo, é possível identificar os genes que estão associados às características com importância agrônoma, genes candidatos são constantemente utilizados nestas análises para o arroz, graças à disponibilidade de sequências obtidas com o sequenciamento de seu genoma.

O mapeamento associativo tem sido mais poderoso na detecção de alelos de pequeno efeito em características complexas, quando comparado com os mapas de ligação (Risch, 2000). Para a realização desse tipo de mapeamento é de extrema importância o conhecimento do desequilíbrio de ligação da população avaliada (Flint-Garcia et al., 2003; Zhao et al., 2005). Nesta metodologia, populações naturais ou populações de germoplasmas são ideais para realização das análises, por apresentarem um histórico de maior recombinação, o que reduz o desequilíbrio de ligação, e elimina a ligação entre o gene de interesse e os marcadores moleculares, exceto em ligações localizadas bem próximas ao gene de interesse, o que permite estimativas mais precisas sobre a localização dos genes de interesse (Abdallah et al., 2003). O mapeamento associativo está sendo utilizado na busca de associação entre marcadores moleculares e características físico-químicas do amido, como a temperatura de gelatinização, o teor de amilose, entre outras que são controladas por um ou mais genes (Bao et al., 2006b).

2. OBJETIVO GERAL

Identificar e validar a associação entre marcadores microssatélites e SNP, posicionados em regiões genômicas envolvidas na rota metabólica do amido, com o teor de amilose e a temperatura de gelatinização do grão de arroz.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar com base na análise de genótipos da Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa, avaliados quanto ao teor de amilose e temperatura de gelatinização, marcadores moleculares previamente identificados na literatura como associados às variações nas características do grão descritas, de modo que a seleção assistida por marcadores seja eficaz na discriminação dos mesmos;
- Identificar novos marcadores moleculares associados a genes que integram a rota metabólica de síntese do amido, cujo polimorfismo explique as variações relacionadas ao teor de amilose e temperatura de gelatinização dos grãos de arroz da Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa, por meio de análise de associação;
- Realizar a avaliação fenotípica individual dos grãos de arroz que compõem a Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa quanto a temperatura de gelatinização;
- Recomendar marcadores moleculares que expliquem a maior porção das variações fenotípicas de interesse em grãos de arroz, de modo que possam ser utilizados em atividades de rotina na Embrapa Arroz e Feijão, auxiliando na avaliação precoce dos genótipos para o programa de melhoramento genético;
- Acrescentar no banco de dados as informações de polimorfismo dos marcadores moleculares, ligados a genes da rota metabólica do amido, nos genótipos da coleção nuclear.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. GÊNERO *Oryza*

O gênero *Oryza* pertence à família Poaceae. É um gênero antigo, em que seus primeiros ancestrais existiram há aproximadamente 65 milhões de anos, a diversificação do gênero ocorreu a cerca de 8 a 14 milhões de anos (Vaughan et al., 2008). O gênero é composto por 23 espécies, que apresentam grande diversificação, a qual está relacionada às adaptações ecológicas. Dentre as espécies, apenas *Oryza glaberrima* e *Oryza sativa* (Lu, 1999) são cultivadas. O cultivo da *Oryza glaberrima* está restrito à África central e Oeste (Second, 1982; Khush, 1997), já a *Oryza sativa* é cultivada em todos os continentes (Abadie et al., 2005).

As espécies silvestres estão distribuídas por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Morishima, 1994). Estas espécies possuem características bastante distintas, com isso, são importantes recursos genéticos. São fonte para exploração de uma enorme variedade de características em programas de melhoramento genético (Clayton & Renvoize, 1986, Vaughan, 1994). Muitas espécies silvestres têm papel importante na produção de cultivares por possuir genes que contribuem para a resistência a estresses bióticos e abióticos. A compreensão das relações genéticas entre as espécies do gênero *Oryza* é essencial para que seja possível a exploração da variabilidade genética existente.

3.2. *Oryza sativa*

Cultivada em países por todo o mundo, a espécie *Oryza sativa* L. foi domesticada entre 8.000 a 15.000 anos atrás no continente asiático e distribuída por vários países acompanhando a migração dos povos (Pereira, 2002). A espécie foi introduzida no Brasil pelos portugueses, por volta do século XVI (Pereira, 2002). Quando os europeus

descobriram que nelas haviam espécies de arroz silvestre. Porém, a espécie introduzida (*Oryza sativa*) teve melhor aceitação pelos imigrantes e nativos, devido às características do grão e a maior adaptabilidade a diferentes regiões de plantio. Estes fatores contribuíram para que a espécie introduzida se tornasse a mais cultivada e consumida no país, permanecendo neste patamar até os dias atuais.

A espécie *O. sativa* tem como característica baixa diversidade genética, uma vez que a diversidade de espécies vegetais normalmente é reduzida durante a domesticação. No entanto, em regiões da Ásia ainda é possível encontrar cultivares com maior diversidade genética (Zhu et al., 2004). Devido aos processos evolutivos, surgiram tipos geneticamente divergentes da espécie, que adaptaram às diferentes condições ecológicas de cada população. Com base na distribuição geográfica, na morfologia da planta e no tipo do grão, a espécie foi subdividida em duas principais subespécies, *indica* e *japonica* (Pereira, 2002). A subespécie *indica* é caracterizada pelos colmos longos, pela alta capacidade de perfilhamento, pelas folhas longas e pelos ciclos tardios. Esta subespécie tem como representantes as variedades de arroz com sistema de cultivo irrigado. A subespécie *japonica* é amplamente cultivada em regiões temperadas, possui colmos curtos, folha estreita verde escura e ciclo curto, e as variedades de arroz de sequeiro pertencem a esse grupo. Acredita-se que as variações encontradas entre as subespécies estejam associadas à adaptabilidade ambiental diferenciada (Lu et al., 2002).

O arroz é uma espécie hidrofílica, no entanto, processos evolutivos têm levado sua adaptação a diversas condições ambientais (Guimarães et al., 2006). Tradicionalmente, o cultivo pode ser realizado em dois ecossistemas, várzeas ou irrigado, onde a irrigação é feita por inundações controladas, e, terras altas ou sequeiro, onde o arroz é cultivado em terras firmes e a irrigação é suplementar (Abadie et al., 2005). Aproximadamente, 90% do cultivo do arroz em todo mundo é realizado em várzeas, pela fatoda maior parte ser cultivada na Ásia, onde o tipo de plantio é o irrigado por inundação. O arroz cultivado em terra alta pode ser encontrado no Brasil e em menor proporção na África.

No Brasil, a maior parte do cultivo do arroz é proveniente de sistema irrigado, sendo responsável por 69% da produção nacional (Guimarães et al., 2006). Em terras altas, o cultivo pode ser conduzido com irrigação suplementar ou sem irrigação. O Centro-Oeste é a região mais importante para o sistema de cultivo sequeiro, em que é caracterizado pela utilização de grande número de máquinas agrícolas e baixa mão-de-obra. A instabilidade climática e a maior ocorrência de doenças, provocam baixa

ras altas, sendo considerada uma produção de alto risco. Porém devido à boa qualidade do grão a cultura pode se tornar mais atrativa ao agricultor. As diferenças ambientais dos dois ecossistemas para o cultivo, irrigado e sequeiro, têm ocasionado variações nas características da planta do arroz, conferindo adaptação aos genótipos (Guimarães et al., 2006).

O. sativa é a espécie mais cultivada do gênero, sendo o principal alimento da dieta de mais da metade da população mundial, principalmente para países em desenvolvimento, como a África e a América Latina (Khush, 1997). O arroz é um produto acessível, com elevado nível nutricional, fornece 15% de proteínas necessárias aos seres humanos e 20% de energia, além de ser fonte de minerais e vitaminas. A maior parte da energia fornecida é proveniente de carboidratos, apenas 0,4% de lipídios (Juliano & Goddard, 1986).

Devido a grande importância da espécie na alimentação e por ser modelo para estudos em gramíneas, esforços são destinados à compreensão do genoma do arroz. Os primeiros sequenciamentos do genoma do arroz foram publicados em 2002, os quais foram realizados com as sequências da cultivar 93-11 (subespécie *indica*) e da subespécie *japônica*, a cultivar Nipponbare. Formado por 12 cromossomos ($2n = 24$) e com tamanho estimado em 389 Mpb, o genoma do arroz possui um total de 37.544 sequências codantes, com densidade de um gene a cada 9,9 kpb (IRGSP, 2005). Com o sequenciamento do genoma foi possível avançar em estudos genéticos e moleculares da espécie, tornando possível o acesso a informações que possibilitam o desenvolvimento de marcadores moleculares que amostram qualquer região do genoma (Rangel, 2008). Além do sequenciamento, são realizadas análises de cDNAs e do proteoma (Kikuchi et al., 2003; Komatsu et al., 2004; Komatsu & Tanaka, 2005). Foi construído banco de dados que integram informações do genoma, transcriptoma e do proteoma do arroz. A utilização das informações dos bancos de DNA e de proteínas é de grande utilidade para elucidar a função e expressão de novos genes.

3.3. AMIDO

3.3.1. Estrutura do amido

O amido é o produto final do processo fotossintético, constituindo a reserva de energia nas plantas. É armazenado em forma de grânulos, fazendo com que seja insolúvel utilizado gradativamente pela planta. O armazenamento dos grânulos pode ser

m folhas, ou definitivo onde são armazenados em órgãos de reserva (Franco et al.,2001), como sementes, tubérculos e raízes.

O amido é um polissacarídeo formado por duas estruturas moleculares complementares, a amilose e a amilopectina. Estas duas estruturas se agrupam em grânulos devido às suas formas helicoidais. A amilose constitui a fração linear da molécula do amido, sendo formada por unidades de (α -1,4)-D-glicose com poucos pontos de ramificações, cerca de 0,3 a 0,5% do total de ligações (Whistler & Bemiller, 1997). O tamanho médio da cadeia de amilose é de 10^3 unidades de glicose e o peso molecular em torno de $1,5 \times 10^5$ a 10^6 (Franco et al.,2001) (Figura 1). A amilopectina é formada por cadeias curtas com ligações (α -1,4)-D-glicose e ramificações com ligações α -1,6 (Figura 2) (Vandeputte et al.,2003), o comprimento das ramificações varia entre 20 e 30 unidades de glicose (Biliaderis, 1991; Wurzburg, 1986).

A proporção de amilose e amilopectina no amido varia de acordo com a espécie. Segundo Wurzburg (1986), a maior parte dos amidos apresentam de 20 a 30% de amilose e 70 a 80% de amilopectina. A diferença na quantidade das frações de amilose e amilopectina, juntamente com o comprimento das cadeias e a distribuição espacial das moléculas conferem características específicas ao amido (Juliano, 1985; Franco et al.,2001).

A caracterização da amilose e amilopectina é comumente realizada de duas formas, pela diferença na capacidade de ligação com o iodo e pela susceptibilidade à ação de enzimas que é diferente em cada estrutura (Juliano, 1979). Estas informações possibilitam avaliar a funcionalidade de cada fração e o comportamento do amido em processos industriais (Franco et al.,2001). As diferentes características e comportamento dos amidos estão relacionados às suas propriedades físicas, químicas e funcionais.

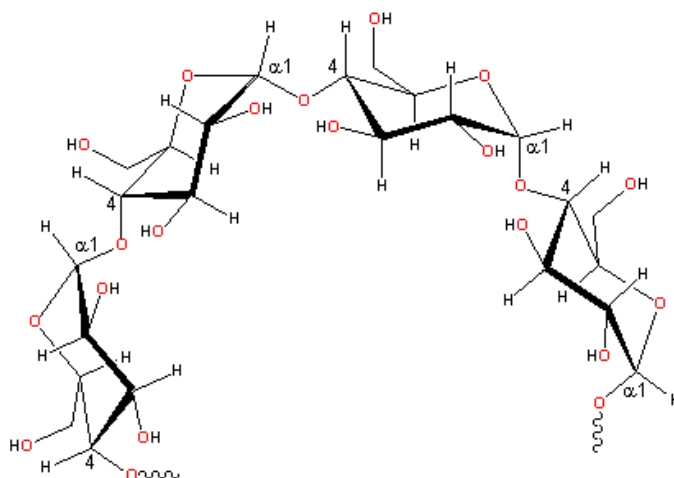


Figura 1. Estrutura linear da amilose, polímero composto por D-glicoses unidas em ligações α -1,4). Figura adaptada de Lajolo & Menezes (2004)

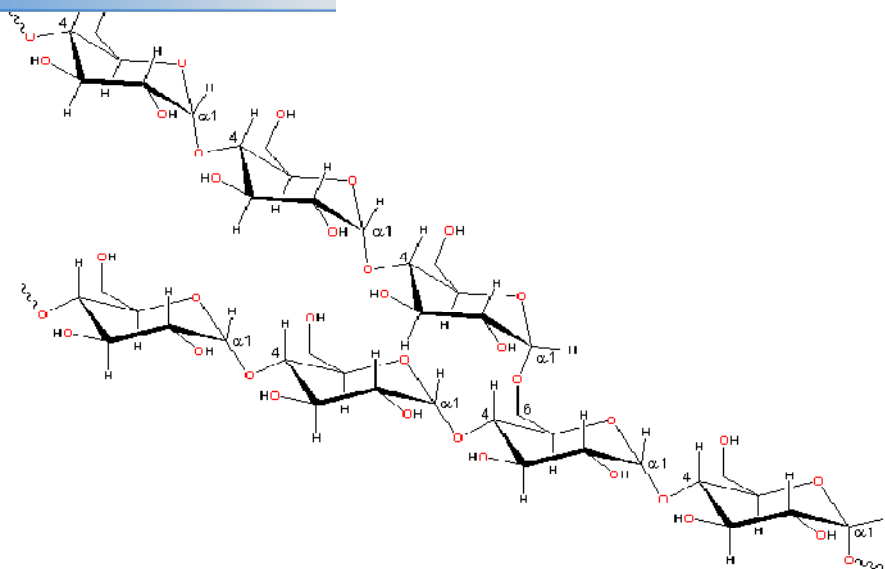


Figura 2. Estrutura da amilopectina demonstrando a forma do polímero e sua ramificação, que é composta por D-glicoses unidas em α -1-4 e α -1-6. Figura adaptada de Lajolo & Menezes (2004)

3.3.2. Amido na alimentação

O amido fornece cerca de 80% de calorias consumida na alimentação humana (Leonel et al., 2002), tornando-se o carboidrato mais importante na dieta humana. De acordo com sua composição, o amido pode ser classificado em amido rapidamente digerível (RDS), amido lentamente digerível (SDS) e amido resistente (AR) (Shu et al., 2009). No arroz cozido, existe uma elevada porcentagem de RDS e baixa porcentagem do AR, geralmente inferior a 3% (Pongjanta et al., 2009). Devido ao valor energético e nutricional, existe grande interesse do amido para a alimentação e para as indústrias que produzem seus derivados (Pongjanta et al., 2009). Algumas das principais fontes naturais de amido são trigo, arroz, milho, batata, mandioca e batata doce.

Espécies tuberosas e raízes fornecedoras de amido são bastante produzidas no Brasil. Uma destas espécies é a mandioca (*Manihot Sculenta* Crantz), que tem teor de amido entre 76 e 91% (Daiuto et al., 2002). A mandioca é utilizada na fabricação de farinha, na produção de amido e também como subproduto em indústrias de diferentes ramos. Outra espécie é a batata-doce (*Ipomoea batatas*), ela é bastante utilizada em indústrias de doces, podendo ser consumida de maneira direta, assada ou cozida. Já a batata (*Solanum tuberosum*) possui cerca de 88% de amido em sua matéria (Pinelli et al., 2006), sendo grande fornecedor de carboidrato na alimentação humana e um dos alimentos mais consumidos no mundo devido sua versatilidade gastronômica, tecnológica

. Outras espécies cultivadas em menor escala e são fonte de amido são: inhame (*Dioscorea* sp) bastante cultivada para o consumo direto, e a mandioquinha-salsa consumida cozida ou em produtos industrializados.(Leonel et al.,2002).

O milho está entre os grãos mais cultivados que fornecem amido.Sua produção é realizada em todo mundo, porém apenas 15% da produção é destinada ao consumo humano.O grão do milho possui 72% de amido da matéria seca, podendo ser consumido de forma direta ou indireta (Paes, 2006). O trigo (*Triticum aestivum*) também tem grande produção, possui cerca de 83% de amido em sua matéria seca (Silva et al.,2008) e pode ser consumido de forma direta, porém sua maior produção está voltada para industrialização de farinha.

O grão de arroz é constituído em maior parte por amido, com cerca de 90% da matéria seca do grão, em menores quantidades estão contidas proteínas, lipídios, fibras e cinzas. Estes nutrientes não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão, nas camadas externas há maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibras, minerais e vitaminas, enquanto que o centro é rico em amido. Dessa forma, o polimento não reduz o teor de amido, mas causa a redução de nutrientes, por isso existe diferença entre a composição do arroz integral e do arroz polido (Walter et al., 2008).

A composição do grão de arroz e de suas frações pode ser alterada devido a diferenças varietais, variações ambientais, manejo, processamento e armazenamento (Zhou et al., 2002), resultando em grãos com características nutricionais diferenciadas. Segundo Frei et al. (2003), a concentração de amido no arroz pode variar devido a fatores genéticos e ambientais.A qualidade do amido pode ser alterada por interações gênicas (Fan et al., 2005).

3.3.3. Biossíntese do amido

A biossíntese do amido ocorre no interior dos cloroplastos e amiloplastos,local onde estão localizadas as enzimas que catalizam a síntese dos polímeros, amilose e amilopectina, utilizando a glicose produzida na fotossíntese (Galliard & Bowler,1987). Existe duas etapas que a antecede a síntese do amido e são essenciais para que ela ocorra. A primeira etapa consiste na formação de glicose-1-fostato nos plastídeos, a segunda é a conversão da glicose-1-fostato em adenosina difosfato glicose (ADPG).

A síntese do amido é realizada pela atividade de várias enzimas (Figura 3), sendo elas a combinação de várias isoformas de duas enzimas (Muller-Rober& Kobmann, 1994). A primeira é a *starch synthase* (SS) que catalisa a transferência de uma unidade

para uma cadeia linear de 1,4-glucana. Esta enzima pode ser dividida em dois grupos, de acordo com a localização, sendo eles: *granule bound starch synthase* (GBSS), que é acoplada ao grânulo do amido *soluble starch synthase* (SSS) localizada no estroma em forma solúvel (MacDonald & Preiss, 1985). A segunda enzima é a *Branching Enzyme* (BE), responsável pela qualidade e quantidade de amido, ela controla a quantidade das ramificações formadas na amilopectina. Por fim, tem-se as *Debranching Enzyme* (DE), são carboidrases que hidrolizam ligações glicosídicas na amilopectina (Manners, 1985), têm a função de remover cadeias externas criadas pela BE e que não foram ligadas em pontos de ramificação.

Vários genes interagem e interferem na quantidade de amido e composição dos grãos (Lee et al., 2009). Qualquer alteração na atividade de pelo menos uma enzima pode desencadear a formação de grânulos de amido com características diferentes. Estas alterações podem ocorrer naturalmente por meio de mutações, mas também podem ser causadas de forma planejada buscando atender interesses do mercado (Franco et al., 2001).

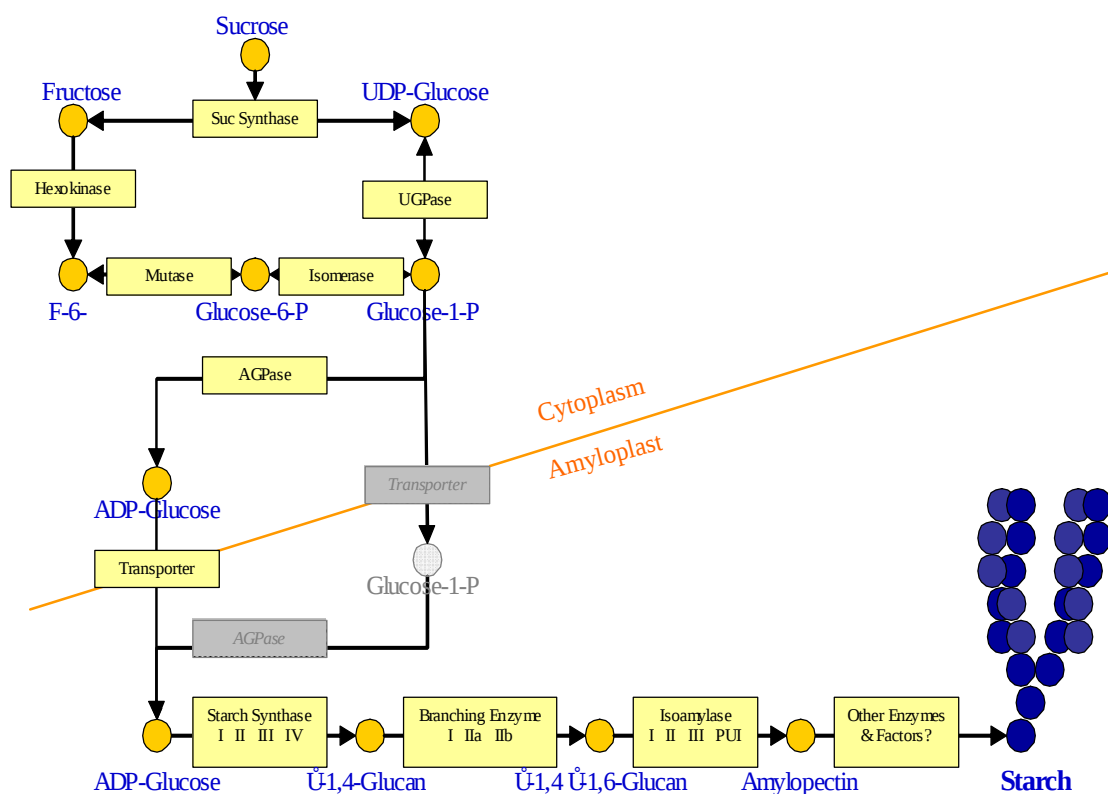


Figura 3. Esquema da rota de biossíntese do amido

3.3.4. Propriedades físico-químicas do amido no grão do arroz

cas do amido determinam o comportamento do grão de arroz ao ser processado e cozido (Bao et al.,2006a). Conhecer a relação entre as características físico-químicas do amido e a qualidade final do grão é de grande importância. Desta forma, é possível selecionar os genitores, por meio do grão, para desenvolver cultivares com características que atendam a preferência do mercado (Liu et al.,2004). A preferência do mercado está estreitamente relacionada à tradição de consumo do grão na região (Battacharya & Ali, 1985). Na utilização em indústrias existe grande variação na característica do grão desejado, pois diferentes produtos derivados de arroz requerem grãos com propriedades específicas do amido.

No Brasil, o grão do arroz é consumido inteiro, com preferência por grãos do tipo longo-fino e translúcido. Para o preparo, a preferência é por grãos que tenham bom rendimento de panela, de rápido cozimento, que fiquem secos e soltos após o cozimento e permaneçam macios após o resfriamento (Castro et al.,1999). O comportamento do grão após o cozimento pode ser avaliado de forma indireta, por meio de análises das características físico-químicas do amido, como o teor de amilose (TA) e temperatura de gelatinização (TG).

O TA exerce forte influência no cozimento do grão de arroz, é o principal determinante das características de cocção do arroz beneficiado. A razão amilose/amilopectina do amido está diretamente relacionada com o volume de expansão, absorção de água e resistência à desintegração do arroz durante o cozimento (Bassinello et al.,2005). Existem cinco classificações para o teor de amilose no grão: o grão tipo ceroso (1-2% de amilose), muito baixo (2-12%), baixo (13-20%), intermediário (21-25%) e alto (26-33%) (Juliano, 1993). De acordo com Juliano (1979), a maciez do arroz cozido é inversamente correlacionada com o TA. Baseado em análises de QTL (*Quantitative Trait Loci*), foi observado que o gene *Waxy* está estreitamente ligada ao TA, podendo ter grande influência nas características do grão cozido (Yi et al.,2009).

A TG do amido está relacionada à temperatura de cozimento do grão, o ponto em que a água é absorvida e os grânulos de amido aumentam irreversivelmente de tamanho, ocorrendo perda de cristalinidade (Parker & Ring, 2001). A gelatinização é um fenômeno físico que ocorre em qualquer alimento com amido, em que as moléculas do grânulo são modificadas por processos térmicos na presença de água (Park et al.,2009). A TG é calculada de forma indireta, por meio da desintegração dos grãos em soluções alcalinas, que simula as reações que ocorrem em um processo de cozimento (Little et al., 1958). Neste método é avaliado o grau de dispersão e clarificação do grão de arroz (Martinez & Cuervas-Perez, 1989). A TG pode ser classificada em três grupos: TG baixa, com a temperatura entre 63°C e 68°C; TG intermediária, com a temperatura entre 69°C e 73°C e

4°C e 80°C. De acordo com Jennings et al. (1979), a maioria das cultivares do grupo *japonica* apresenta TG baixa. Por outro lado, a grande parte do grupo *indica* tropical apresenta TG intermediária e alta (Vieira & Rabelo, 2006).

3.4. MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são fragmentos de DNA que permitem distinguir dois ou mais indivíduos, por meio de polimorfismo, e são herdados geneticamente (Borém & Miranda, 2005). Os marcadores moleculares são usados com o intuito de definir um genótipo, sem a necessidade de conhecer todo o conteúdo da sequência de DNA do genoma (Duran et al., 2009).

O uso de marcadores moleculares na avaliação do polimorfismo do DNA em grupos vegetais e animais é um dos desenvolvimentos mais significativos da biologia molecular. Esta técnica possibilitou grandes avanços na investigação do genoma e impulsionou as pesquisas voltadas para genética de plantas (Yi et al., 2009). Com base no polimorfismo do DNA é possível caracterizar a variabilidade genética, identificar indivíduos ou cultivares, avaliar a estruturação populacional, construir mapas genéticos, detectar regiões do genoma associadas à característica de interesse agrônomo, realizar seleção assistida, entre outros. O polimorfismo das sequências de DNA ocorrem por meio de dois principais fenômenos, a mutação e a recombinação (Caixeta et al., 2006).

O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (Mullis & Faloona, 1987), possibilitou a multiplicação de fragmentos de DNA de modo simples e eficiente, viabilizando a ampla utilização dos marcadores moleculares. Esta técnica consiste em amplificar *in vitro* fragmentos de DNA utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), a enzima DNA polimerase, bases nucleotídicas e tampão salino (Figura 4). A amplificação dos fragmentos é realizada com a separação da fita dupla de DNA, anelamento do *primer* a sua região homóloga e extensão da cadeia pela DNA polimerase (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores moleculares baseados na técnica de PCR diferem entre si pela especificidade de anelamento ao DNA e pelo tipo de sequência amplificada.

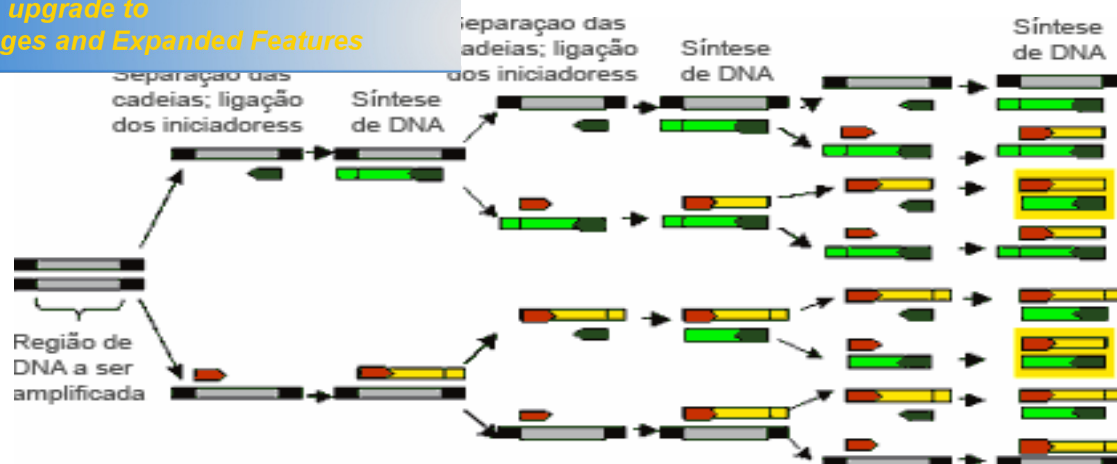


Figura 4. Etapas de amplificação do fragmento de DNA em uma reação da polimerase em cadeia PCR

Dentre as classes de marcadores moleculares baseados em PCR, existem os marcadores que amplificam regiões genômicas aleatórias, como os marcadores RAPD(*Random Amplified Polymorphic DNA*), e os que amplificam regiões específicas, como os microssatélites (SSR *Simple Sequence Repeat*).

Os marcadores SSR são compostos por sequências simples repetidas de 2 a 6 nucleotídeos, denominados motivos. O número de repetições dos motivos de um marcador pode variar entre os indivíduos, sendo a base genética do seu polimorfismo (Temnykh et al., 2001). Este marcador apresenta herança do tipo co-dominante, é disperso por todo o genoma, tem detecção multialélica e é facilmente reproduzível, o que favorece a comparação entre estudos conduzidos em diferentes laboratórios (McCouch et al., 2002; Caixeta et al., 2006). As sequências das regiões que flanqueiam os SSR são conservadas, principalmente em indivíduos da mesma espécie (Poncet et al., 2004). Os SSR são marcadores utilizados em diferentes tipos de análises, como em construção de mapas genéticos, mapeamento associativo, estudos de diversidade genética (Ishii et al., 2001) e caracterização de bancos de germoplasmas (Akagi et al., 1997; Zhu et al., 2004). Para o arroz, assim como em outras espécies cultivadas, os SSR são bastante utilizados para estudar a estrutura populacional e história demográfica da espécie (Garris et al., 2005). Além de serem intensivamente utilizados para caracterizar os genótipos dos bancos de germoplasma (Ni et al., 2002; Lu et al., 2005).

Marcadores moleculares baseados em polimorfismo de uma única base (SNP) foram descritos recentemente (Kwock et al., 1996; Risch & Merikangas, 1996), eles possuem polimorfismo baseado em inserção ou deleção (indel) e/ou substituição de base. Esta classe de marcador tem natureza bialélica, podendo ocorrer em regiões expressas e não expressas do genoma. Tornou-se bastante atrativo em análises

amente distribuído no genoma de vários organismos, sendo útil para o desenvolvimento de mapas de alta resolução (Caixeta et al., 2006). Os SNP localizados em genes conhecidos podem proporcionar uma rápida análise de alelos ligados a características de interesse agrônomo, tornando-se marcadores funcionais (Duran et al., 2009). O método padrão para o desenvolvimento desses marcadores consome tempo e mão-de-obra intensiva (Gupta & Varshney, 2000), porém, com a crescente quantidade de informações disponíveis das sequências de DNA novas e eficazes estratégias estão sendo proporcionadas (Varshney et al., 2005).

No arroz é estimado que os SNP sejam distribuídos em todo o genoma a uma frequência de 1 SNP a cada 170pb, resultando em 2,35 milhões de SNP (Hayashi et al., 2004). Por ser um marcador estável em termos evolutivos, está sendo bastante utilizado em estudos de genética populacional, seleção assistida, mapeamento de EST e integração de mapas físicos e genéticos.

Outra classe de marcadores são os STS (*Sequence Tagged Sites*), estes marcadores foram propostos por Olson et al. (1989). Inicialmente os STS foram utilizados em humanos, buscando unificar a linguagem utilizada entre laboratórios envolvidos no mapeamento físico do genoma humano (Caixeta et al., 2006). Em plantas, foi utilizado pela primeira vez por Paran & Michelmore (1993). Estes marcadores são sequências pequenas de DNA com aproximadamente 100 a 500 pares de bases, podendo ser facilmente amplificados por PCR ou detectados via hibridização. São marcadores do tipo co-dominantes e amplificam sequências específicas no genoma. Para o desenvolvimento dos *primers* que flanqueiam as regiões STS é necessário ter um conhecimento prévio da sequência analisada (Caixeta et al., 2006). Isso dificulta a utilização desse marcador em larga escala, pois a maior parte das espécies não têm seu genoma sequenciado, que é um procedimento de custo ainda elevado (Feng et al., 2005). Uma outra opção para desenvolver estes marcadores é por meio dos produtos amplificados derivados de marcadores RFLP e AFLP, que podem ser convertidos em sequência de STS (Matsui et al., 2001; Nakajima et al., 1999; Ji et al., 2008).

Outra metodologia para detectar variações nas sequências de DNA é por meio do polimorfismo gerado via restrição dos fragmentos amplificados. Essa técnica caracteriza os marcadores do tipo CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), que tem como característica a co-dominância e ser facilmente detectadas por eletroforese em gel de agarose (Llic et al., 2004). O polimorfismo desses marcadores baseia-se em SNP, em que o polimorfismo altera a sequência de DNA alvo da enzima de restrição impedindo que ela se ligue e realize a clivagem. Com isso, o polimorfismo é avaliado pelo tamanho do fragmento, com base na sequência clivada ou não clivada. Cerca de 30 a 40% dos SNP

endonucleases de restrição (Llic et al.,2004; Thiel et al., 2004).

3.5. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Desequilíbrio de ligação (DL) é a associação não aleatória de alelos de diferentes locos (Flint-Garcia et al.,2003;Zhao et al.,2005), medea independência entre alelos de dois ou mais locos (Hartl, 1987). Os fatores que influenciam no padrão do DL em uma população são os fatores evolutivos, como a recombinação, seleção natural, deriva genética, mutação, gargalo populacional e ao sistema reprodutivo (Flint-Garcia et al., 2003; Gupta et al., 2005). Sendo que, a recombinação gênica é a força capaz de reduzir a extensão do desequilíbrio de uma região genômica (Ferreira & Grattapaglia, 2006). Em uma população ideal em que o cruzamento é aleatório, não havendo seleção e mutação, a segregação dos locos acontece de maneira independente não ocorrendo o desequilíbrio de ligação. De maneira oposta, a ligação dos locos, a seleção e a sub-estruturação das populações aumentam os níveis de DL (Falconer & Maccay, 1996; Flint-Garcia et al., 2003).

A extensão do desequilíbrio é variável ao longo do genoma, havendo regiões com DL bastante extenso e regiões com extensão menor. No genoma das plantas existe grande heterogeneidade em relação à taxa de recombinação. Normalmente, parte do DNA rico em regiões gênicas possui alta taxa de recombinação e região com baixa taxa de recombinação possui poucos genes (Buckler & Thornsberry, 2002). Para a maioria das espécies de plantas, a extensão do DL ainda é pouco caracterizada, os estudos relacionados ao desequilíbrio de ligação se restringem em aproximadamente a uma dezena de espécies vegetais (Gupta et al., 2005).

Para o arroz, que é uma espécie autógama, o DL pode chegar a uma extensão de até 100 kilobases (Kb) (Garris et al., 2003), sendo que as extensões maiores são observadas em regiões com forte pressão de seleção (Li et al.,2009). Em plantas alógamas observa-se o inverso, a extensão do DL tende a ser reduzido devido a elevada taxa de recombinação.

Existem diversos métodos estatísticos para estimar o DL, dentre eles estão a matriz de desequilíbrio (D) e a plotagem de estimativa de desequilíbrio (r^2), questões bastante utilizados para avaliar o declínio do DL em uma região genômica. Estas duas estatísticas refletem diferentes aspectos do desequilíbrio de ligação, apresentam diferentes abordagens em diferentes condições (Figura 5). O método r^2 estima o DL par-a-par em função da distância em pares de bases entre as mutações identificadas na

}). Este método demonstra como os marcadores moleculares utilizados em uma análise podem estar correlacionados aos QTLs de interesse (Hill & Weir, 1994; Abdallah et al., 2003; Flint-Garcia et al., 2003). No método de matriz de desequilíbrio, as estimativas de desequilíbrio é realizada par-a-par em função de distância entre mutações e ao mesmo tempo é calculado o nível de significância de cada estimativa pelo teste exato de Fisher.

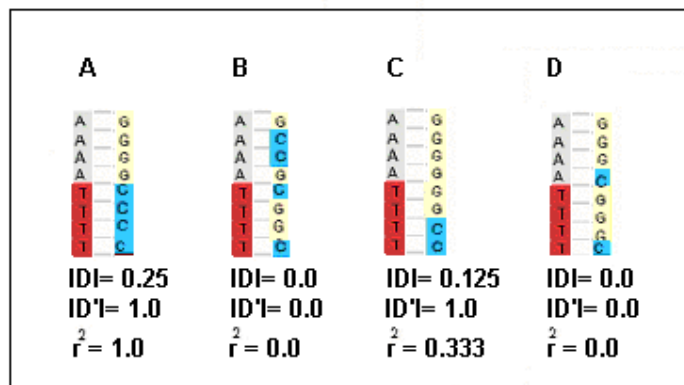


Figura 5. Esquema com diferentes padrões de desequilíbrio de ligação entre diferentes indivíduos em uma região (Fonte: Gaut & Long, 2003, com adaptações).

O interesse em conhecer o desequilíbrio de ligação em uma população aumentou bastante nas últimas décadas, devido às novas tecnologias em análise genômica que utilizam o DL em suas premissas. Metodologias como o sequenciamento de DNA e análise genética baseada em SNP, têm possibilitado estimar a extensão do DL e determinar os haplótipos formados. Este conhecimento facilita a identificação e monitoramento de regiões genômicas que estejam associadas a genes alvo (Rafalski & Morgante, 2004). Sendo assim, a estrutura do desequilíbrio de ligação é um fator determinante em mapeamento associativo (Maurer et al., 2006).

3.6. MAPEAMENTO ASSOCIATIVO

O melhoramento genético de plantas busca, por meio de cruzamentos, gerar combinações alélicas que resultem em características favoráveis ao interesse agrônomo. Para tanto, marcadores moleculares podem auxiliar na identificação precoce das características e facilitar na seleção dos indivíduos para compor o cruzamento. Porém, a identificação dos genes responsáveis pelo controle das características de interesse é um grande desafio (Ferreira & Grattapaglia, 2006). Para identificar a localização de genes e regiões genômicas que controlam características de interesse são construídos mapas de ligação, com o uso de marcadores moleculares, seguido pela identificação de QTL (Tanksley et al., 1989). No entanto, os mapeamentos

ativas apresentam eficiência reduzida na detecção de locos de pequeno efeito, que são numerosos e importantes na definição final do fenótipo (Ferreira & Grattapaglia, 2006). Diante da necessidade de análise mais robusta e da disponibilidade de tecnologias mais avançadas para a genotipagem e análise dos dados, foi desenvolvido o mapeamento associativo, uma metodologia voltada para estudos de características quantitativas complexas.

O mapeamento associativo tem como objetivo detectar correlações entre os genótipos e fenótipos em uma amostra de indivíduos, baseado no desequilíbrio de ligação (DL) (Zondervan & Cardon, 2004). Este método de análise busca a identificação e isolamento de genes relacionados às características quantitativas (Risch, 2000).

Este tipo de mapeamento foi utilizado inicialmente em análises com humanos, para mapear genes relacionados a doenças com características complexas, a técnica tornou-se bastante atrativa em outras áreas pela vantagem de não ser necessário a utilização de indivíduos aparentados na população, diferente dos métodos já conhecidos (Risch, 2000). Pode ser considerada uma estratégia complementar ao mapeamento de ligação, com potencial para obter resolução em nível de genes (alelos) de características quantitativas (Fusari et al., 2008).

Quando comparado às análises de ligação, o mapeamento associativo apresenta como vantagem a detecção de associações genéticas válidas para toda a população e não somente para um cruzamento específico (Ferreira & Grattapaglia et al., 2006). Desta forma os marcadores com associações podem ser utilizados em seleção assistida, como em estudos realizados com trigo (Breseghello & Sorrells, 2006), cevada (Kraakman et al., 2006) e milho (Yu & Buckler, 2006). O mapeamento associativo identifica não apenas o QTL, mas também o polimorfismo dentro de um gene responsável pela variação fenotípica (Palaisa et al., 2003; 2004).

O mapeamento associativo pode ser realizado em populações naturais, coleções de germoplasma, conjunto de materiais elite, entre outros, utilizando como premissa a recombinação genética. É comum a existência de certo grau de subdivisão (estrutura populacional) das populações avaliadas, com isso, é necessário conhecer a estrutura populacional, para evitar falsas associações entre o fenótipo e o genótipo (Pritchard & Rosenberg, 1999; Pritchard & Donnelly, 2001). Buscando controlar as falsas associações foram desenvolvidos métodos de mapeamento associativo que utilizam a informação da estrutura populacional (Yu et al., 2006).

O uso de genes candidatos em mapeamento de associativo é amplamente utilizado. Este método consiste em testar a associação utilizando um gene com função conhecida ou inferida, e sua ação tem grande influência na característica quantitativa de

. Um gene candidato pode ser definido como gene relacionado a uma dada característica agronômica de interesse. Seu uso depende da disponibilidade de informação parcial ou completa da sequência do gene. Esta é uma metodologia eficiente e seu resultado é bastante útil em seleção assistida por marcadores (Rothschild & Soller, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 242 acessos pertencentes à Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa (CNAE) (ApêndiceA), representando os estratos LCI (Linhagens e Cultivares Introduzidas) e LCB (Linhagens e Cultivares Brasileiras). Cada acesso foi representado por uma única planta. O estrato LCI, composto por 148 acessos, representa linhagens e cultivares desenvolvidas em programas de melhoramento estrangeiros, com 72 acessos de sistema de cultivo irrigado e 76 de sistema de cultivo sequeiro. O estrato LCB, representado por 94 acessos provenientes de programas de melhoramento brasileiros, é composto de 54 acessos com sistema de cultivo irrigado e 37 acessos com sistema de cultivo sequeiro.

4.2. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO GRÃOS DO ARROZ

Para avaliar a TG dos acessos foram utilizados grãos colhidos em experimento com os acessos da CNAE conduzido no município de Santo Antônio de Goiás (altitude 749m; 16° 40' 43" S; 49° 15' 14" W), no ano de 2007. O plantio foi realizado sob condições de cultivo irrigado, seguindo o delineamento experimental de blocos aumentados de Federer, com parcelas de 4 linhas de 5 metros e densidade de 20 plantas/metro. Os grãos coletados foram obtidos a partir dos quatro metros centrais das duas linhas centrais das parcelas. A análise de TG foi realizada seguindo o protocolo descrito por Martínez Racines et al., (1989) (Anexo 1).

Os dados de TA dos grãos foram obtidos com base nas análises realizadas nos anos de 2004 e 2005, utilizando os mesmos acessos.

4.3.1. Extração e quantificação do DNA genômico

A extração do DNA genômico dos 242 acessos foi realizada utilizando tecido foliar. A extração foi realizada seguindo o protocolo de CTAB 2%, de acordo com Brondani et al. (2002) (Anexo2). A concentração do DNA em cada amostra foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1% (Anexo3), por meio de comparação visual do DNA extraído com o DNA-padrão do fago lambda (50, 100, 200 e 400 ng). Após a determinação da concentração do DNA, as amostras foram diluídas em água ultrapura para uma concentração padronizada de 3 ng/ μ l.

4.3.2. Marcadores molecular

Baseado na literatura, foram selecionados 10 marcadores moleculares de regiões SSR e SNP que são relacionados ao TA e TG de arroz (Tabela 1). Também foram desenvolvidos, no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, 30 marcadores moleculares de regiões SSR e SNP (Tabela 2). O desenvolvimento foi feito a partir de consulta das sequências do genoma de arroz disponibilizadas no banco de dados Gramene (www.gramene.org). Com o auxílio do programa *Primer3*, os pares de *primers* foram desenhados a partir de sequências flanqueadoras do loco-alvo. Todos estes marcadores estão localizados em regiões gênicas envolvidas na rota metabólica da síntese do amido (Figura 6).

relacionados ao TA-TG da espécie *Oryza sativa* descritos na literatura,

Marcador Molecular	Gene	Característica associada*	Tipo	Método de detecção	Referência
RM190	<i>Wx</i>	TA	SSR	Poliacrilamida	Ayres at al.1997
RM197	<i>SBE1</i>	TA-TG	SSR	Poliacrilamida	Bao et al., 2002
OSR21	<i>SS1</i>	TA-TG	SSR	Poliacrilamida	Akagi et al., 2003
W2R	<i>Wx</i>	TA-TG	CAPS	Enz.restrição	Ayres at al.1997
SBE3	<i>SBE3</i>	TA-TG	CAPS	Enz.restrição	Han et al.,2004
SBE1	<i>SBE1</i>	TA-TG	STS	Agarose	Han et al.,2004
F7	<i>SSIIa</i>	TG	SNP	Agarose	Bao et al., 2006b
F22	<i>SSIIa</i>	TG	SNP	Agarose	Bao et al., 2006b
R1	<i>SSIIa</i>	TG	SNP	Agarose	Bao et al., 2006b
R21	<i>SSIIa</i>	TG	SNP	Agarose	Bao et al., 2006b

desenvolvidos na Embrapa Arroz e Feijão a partir de sequências de genes da rota de biossíntese do amido de grãos de arroz disponibilizadas pelo banco de dados do Gramene (www.gramene.org)

Marcador Molecular	Gene/Enzima	Tipo	Forward	Reverse	Método de detecção*
SS3s	<i>Soluble starch synthase 3</i>	SSR	cagatcacgtcaagcaaagg	gaggtgtaggagctgtaggaa	Poliacril
SS1s	<i>Ss1</i>	SSR	atcctgctgctgctgtgtc	tctccctcgcttaaaaccaa	Poliacril
GL3s	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i>	SSR	gactgcaacaccacgaaaaa	tcagtgcacatgctctctctc	Poliacril
SS2.1s	<i>SsII-1</i>	SSR	cctctctctgacacacactc	gaacatccacgcgattcgag	Poliacril
GL1s	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i>	SSR	gtgtagcatcggtagcaca	aacctgagttatactgttc	Poliacril
GB1s	<i>Wx</i>	SSR	tccttcagttcttctatctcaa	gaggggaaacaaagaattataaaca	Poliacril
SS2.1	<i>SsII-1</i>	SNP	tgatgaagttccagacgatga	catcactagtgcctcagca	Seq
GGP	<i>Glycogen synthase 2</i>	SNP	ttctggatgtggttgcatga	tgctggtttacgcagaaaga	Seq
GL3	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i>	SNP	ctgcatgtctgtacaaaatcattg	gacggagagagtacacctgtaga	Seq
GS2	<i>Glycogen synthase</i>	SNP	attgctgccagaaacatag	cgcttagggagctggagtct	Seq
GG2	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i>	SNP	tggaaattgtggtgatcctga	ggctacgctatccgtctga	Seq
CA-2	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	SNP	cgtgtcagcatgaggaagc	gagcttttcaaacacaaac	Seq
SS1	<i>Ss1</i>	SNP	ccttcgtttcacaatgtaagtca	cacgccaaggataattggat	Seq
AG	<i>Sbe1</i>	SNP	cttccgatttgatggggta	tagttgcttccggcaagagt	Seq
GGA	<i>Glycogen synthase</i>	SNP	gaaagcagcaaaaagcatc	ttggtatttccgctcaagg	Seq
GB1	<i>Wx</i>	SNP	tatgacacgccggtggag	gtgagccgcatgatgtgt	Seq
GPG	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	SNP	gaggtacgtggagtggctgt	aggggtggtctcgatcttgg	Seq
GGT	<i>Starch synthase III</i>	SNP	tgctgtcagcgaacaaaatc	caaatcatcgtcaccaccag	Seq
GB1b	<i>Granule-bound starch synthase 1b</i>	SNP	ccagaataaaccgtccaga	ctcctgcagccttctaata	Seq
SS2.2	<i>SsII2</i>	SNP	ggcggctactctcttctc	ctgacttcgtcttcgccttc	Seq
GPI	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	SNP	gaggtacgtggagtggctgt	aggggtggtctcgatcttgg	Seq
GSG	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i>	SNP	gtgctgggacaaggctgtat	cgcagcaagaactcaacaa	Seq
GSG.2	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i>	SNP	caggcgggcattataagaag	acacatgggattgtctggatt	Seq
SS2.3	<i>SsIIa</i>	SNP	agaaagggtgtggacatcatcg	atggcgtagagctggttag	Seq

desenvolvidos na Embrapa Arroz e Feijão a partir de sequências de genes da rota de biossíntese do amido de grãos de arroz disponibilizadas pelo banco de dados do Gramene (www.gramene.org)

Marcador Molecular	Gene/Enzima	Tipo	Forward	Reverse	Método de detecção
PGE	<i>Phosphoglucomutase</i>	SNP	gagctgggatgagagaaacg	cgaaaacacattgacgatgg	Seq
SS3	<i>Soluble starch synthase 3</i>	SNP	aggggaagtgtcaggacatgg	tgtcactgtatggatcccaaatt	Seq
CB	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	SNP	gttgagccggcatattctgt	gttcctcatgctgacacga	Seq
GG	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase</i>	SNP	cccttctggtttgtgcatt	tcatgtgcatggcagaagtt	Seq
CHOL	<i>Phosphoglucomutase</i>	SNP	cttcctccgcggtgcaagc	agaagaggaggtggagaagg	Seq
CYTO1	<i>Phosphoglucomutase</i>	SNP	cagtcggatcagttagtctc	gttctggaggtaatgaggct	Seq
CYTO2	<i>Phosphoglucomutase</i>	SNP	ggaacttgatggatgctgga	ttatcgctccaaggtgtc	Seq
CYTO3	<i>Phosphoglucomutase</i>	SNP	ccgtgtctacatcgagcgt	ggccagtgtactcttgcatt	Seq

Poliacril ã poliacrilamida; Seq - sequenciamento

Ciclo de Calvin

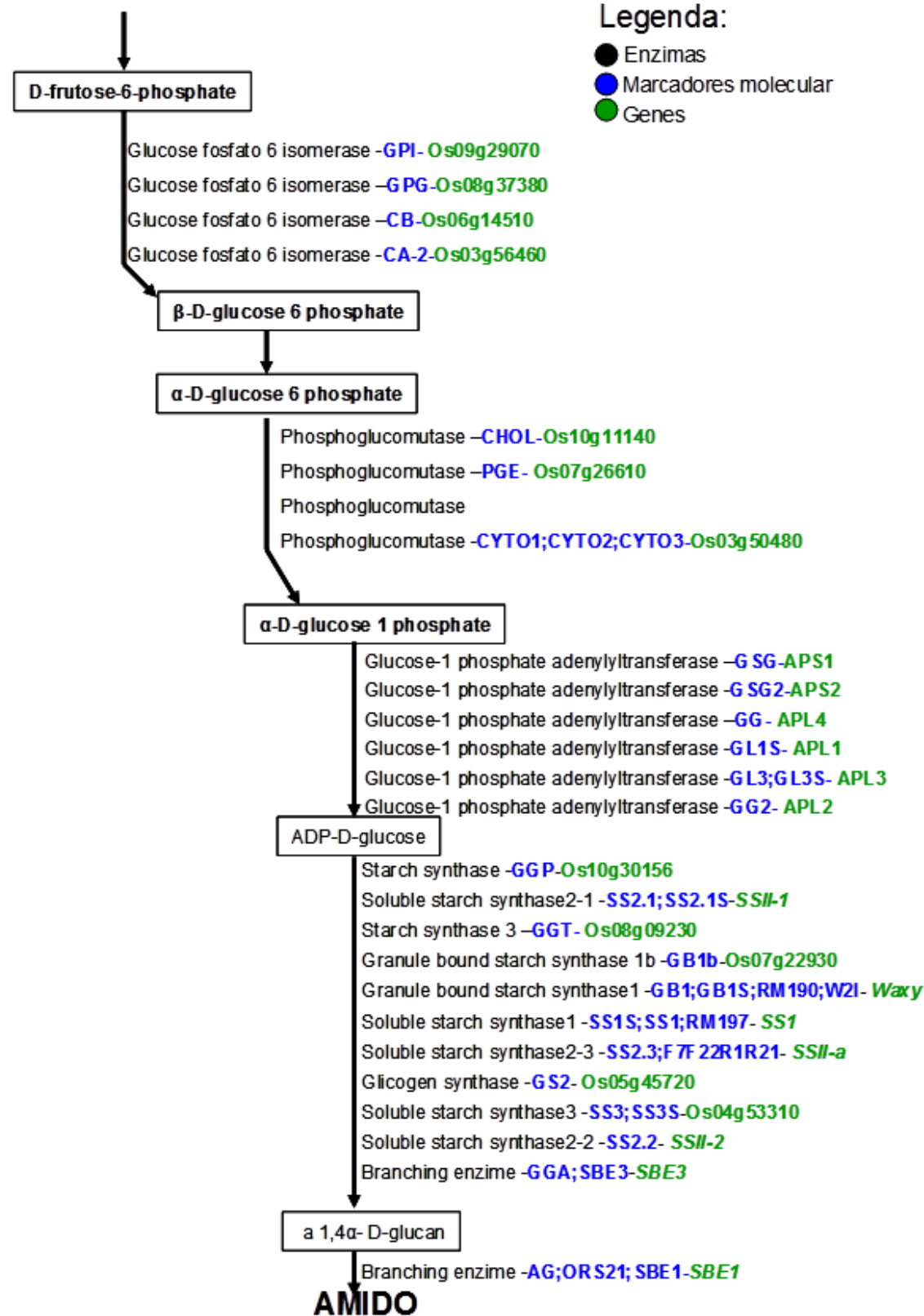


Figura 6. Esquema da rota metabólica da biossíntese do amido, com o posicionamento dos genes, enzimas envolvidas e marcadores moleculares

de polimorfismo nos marcadores moleculares e o sequenciamento dos marcadores SNP foram realizados com um grupo de 24 dos 242 acessos da CNAE (Tabela 3). Formando uma mini coleção, este grupo é composto por 12 acessos com sistema de cultivo irrigado e 12 com sistema de cultivo sequeiro, que abrangem as três classes de TA, alto (26 a 33%), intermediário (21 a 25%) e baixo (12 a 20%), com isso o grupo de cada sistema de cultivo possui acessos representando cada classe de TA (Tabela 3).

Tabela 3. Amostra com 24 acessos, obtidos a partir dos 242 acessos LCB e LCI da Coleção de Germoplasma de arroz, agrupados de acordo com as classes de TA e sistema de cultivo

Classe de TA	Acessos			
	Irrigado	TA (%)	Sequeiro	TA(%)
Alto (26 a 33%)	ARC-10666	26	CNA0004243	29
	BR IRGA-409	27	SONA	29
	IR-50	29	ZHENSHAN-97-A	28
	CARREON	28	BRS PRIMAVERA	26
Intermediário (21 a 25%)	LEBONNET	25	IRAT124	25
	LAC-12	25	IAPAR L99-98	27
	BASMATI 370	25	CO18	26
	IRAT-10	25	B8503-TB-19-B-3	25
Baixo (12 a 20%)	M-40	16	TOX1871-29	19
	VITRO	20	CT10037-9-4-M-1-1P 2M	20
	KU94-2	20	YUNLUNI	18
	KU56-3	18	TOX1785	16

4.3.3. Protocolos de amplificação para os de marcadores moleculares

Otimização e amplificação via PCR do conjunto de *primers* F7-F22-R1-R21

O conjunto de *primers* F7-F22-R1-R21 descrito por Bao et al. (2006b) foram desenvolvidos para amplificar, via PCR, a região do gene *SSIIa*, onde é localizado o SNP GC/TT. Este polimorfismo está relacionado à TG, sendo CG associado à alta TG e TT à baixa TG. Nesta metodologia são confrontados dois pares de *primers*, sendo F7 e F22 *forward*, R1 e R21 *reverse*, detectando os dois SNP em uma única PCR (Figura 7).

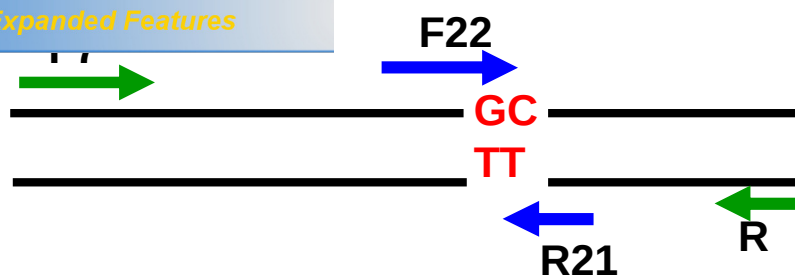


Figura 7. Esquema representando estratégia de detecção dos SNP GC/TT com o conjunto de pares de *primers* F7-F22-R1-R21

Vários testes de amplificação foram realizados para este grupo de marcadores, buscando boa amplificação dos fragmentos. Para isso, foram feitos testes de PCR com diferentes marcas de reagentes em diferentes concentrações, sendo que os melhores resultados foram obtidos com kit Qiagen Multiplex PCR. A reação teve volume final de 5 μ L composto por: 3 ng de DNA, 0,2 μ M de cada *primer*, 1X do kit Qiagen Multiplex PCR, Master Mix 2X, 0,5X de Q-solution, e água *RNase-free* para completar o volume. A etapa de amplificação da PCR foi iniciada com desnaturação a 94°C por 15 minutos, seguido por 40 ciclos com: etapa inicial de desnaturação por 90 s (segundos) a 94°C, anelamento dos *primers* por 60s a 50°C, e extensão com 90 s a 72°C, e uma extensão final de 15 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2,5%.

Otimização e Amplificação via PCR de marcadores SSR, STS e CAPS

Para a amplificação dos marcadores SSR, STS e CAPS, foram realizados testes das concentrações do DNA e dos reagentes que compõe o *mix* de amplificação. Também foram testadas diferentes temperaturas de anelamento. Desta forma, foi possível definir um protocolo que apresentou bons resultados para as três classes de marcadores.

As PCR foram realizadas com volume final de 20 μ L, contendo: Tris HCl a 10 mM (pH 9.0), KCl 50 mM, Triton 0,1% 100X, MgCl_2 2 mM, dNTPs 0,1 mM, *primers forward* e *reverse* com concentrações de 200nM, 0,5 unidade de Taq polimerase e DNA com concentrações variáveis, sob as condições de: 5 minutos a 94°C seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 60 segundos para temperatura de anelamento, que é variável de acordo com o marcador e 60 segundos a 72°C, por fim uma extensão final de 7 minutos a 72°C. As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

es tiveram visualização do polimorfismo por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (Anexo 4). Já para os marcadores STS e CAPS os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 3% (Anexo 3).

Tratamento com enzimas de restrição para os fragmentos dos marcadores CAPS

Após a amplificação via PCR, o produto dos marcadores CAPS (SBE3 e W2R) foram submetidos a uma nova etapa. Os produtos da PCR foram tratados com enzima de restrição para a clivagem do fragmento alvo, as enzimas são específicas para cada marcador.

Para o tratamento do produto amplificado do marcador SBE3 foi utilizada a enzima *SpeI*. O tratamento foi realizado seguindo protocolo descrito por Han et al. (2004), com volume total de 15 µL contendo, 1,5 µL de buffer 10X (Takara Co, Tokyo, Japan), 8 µL de água ultra-pura, 5 µL do produto da PCR e 5 unidades da enzima. Em seguida foi submetido à termociclagem de 3 min a 95°C; 35 ciclos de 45 s a 94°C, 1 min a 65°C, e 1,5 min a 72°C e extensão final de 72°C por 10 minutos, em seguida foi incubada em estufa por 2 horas a 37°C.

Para o tratamento da amplificação do marcador W2R foi utilizada a enzima *AccI*, seguindo o protocolo descrito por Ayres et al. (1997), com volume final de 26,2 µL contendo, MgCl₂ a 25M, 20 µL do produto da PCR e 2 unidades da enzima, em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. A visualização do polimorfismo dos marcadores foi feita em gel agarose 3%.

Otimização e amplificação via PCR para marcadores SNP

Para os marcadores SNP desenvolvidos para este trabalho, a otimização do protocolo da PCR foi iniciada com testes para diferentes concentrações de reagentes do *mix* de amplificação e do DNA. Também foram testados o tempo e a temperatura de cada etapa do ciclo de amplificação. Os melhores resultados foram encontrados para o seguinte protocolo: volume final de 25 µL contendo, Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, TritonX-100 (0,1%), 0,2mg/ml de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 1,66 mM de MgCl₂, 0,25 µM de dNTPs, 1 unidade de Taq polimerase, 6ng de DNA, 2,5 pmol do *primer reverse*, 3 pmol do *primer forward*. O *primer forward* foi utilizado em concentração maior para que o *primer reverse* fosse esgotado durante a PCR. Com isso, não é necessário realizar a etapa de purificação da PCR. As condições de amplificação foram 94°C por 5 minutos, 45 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um passo de

os. Em seguida as amostras foram quantificadas em gel de agarose 1,5%.

A segunda etapa consiste na reação de sequenciamento, em que foi utilizado kit *BigDye 5X*, Tris-HCl 1M, 5mM de $MgCl_2$, 3.2 μ M de *primerforward* e 5ng do produto de amplificação da PCR. A terceira etapa do processo consistiu na lavagem do fragmento, utilizando 40 μ L de isopropanol 70% em cada amostra, após um período de repouso de 20 minutos, os produtos foram centrifugados por 45 minutos. Em seguida, o líquido foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Após o precipitado estar totalmente seco, foi adicionada em cada amostra em 10 μ L de formamida e mantidos à temperatura de 95°C por 5 minutos para que houvesse a desnaturação do DNA. Em seguida, os produtos purificados foram submetidos à eletroforese capilar em um analisador automático de fragmentos ABI3100 (*Applied Biosystems*, Inc).

4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi construído histograma das distribuições dos acessos entre as classes de TA e TG, possibilitando a comparação da distribuição entre os anos em que as análises foram realizadas. Os histogramas foram construídos no programa Windows Excel 2007 (Microsoft Corp, States of Washington, USA).

Foi realizada análise buscando identificar alelos privados para os sistemas de cultivos e para as classes de TA e TG. Esta análise foi realizada com o auxílio do programa *Genetic Data Analysis* (GDA) (Lewis & Zaykin, 2001). A variabilidade genética foi avaliada com base na da riqueza alélica, do número médio de alelos por loco e da diversidade genética (H_e) (Nei, 1978). Também foi testado o desequilíbrio de ligação (LD) entre os pares para os marcadores SSR, CAPS, STS e F7-F22-R1-R21, utilizando 10.000 randomizações. Para realizar estas análises foi utilizado o programa FSTAT (Goudet, 2002).

A divergência genética dos acessos foi avaliada por meio da construção de dendrograma de similaridade genética, com as informações dos marcadores SSR, CAPS, STS e o conjunto de *primers* F7-F22-R1-R21. Os dados dos alelos, que foram nomeados de acordo com o tamanho dos fragmentos (em pb), foram transformadas em dados binários de presença ou ausência do alelo. Esta análise foi realizada utilizando o método de Ward (1963) no programa SAS versão 8 (SAS Institute Inc., USA).

Todos os fragmentos sequenciados foram submetidos à análise de qualidade da sequência pelo programa Phred versão 0.020 (Ewing et al., 1998), aplicando um valor de

biliza as sequências geradas, uma vez que avalia a probabilidade de a base nucleotídica chamada estar correta.

Para a detecção dos SNP, as sequências nucleotídicas foram analisadas pelo programa *Staden Package* versão 1.6.0 (Staden et al., 2000). As análises foram iniciadas no módulo Pregap4, que tem como função avaliar os dados brutos das sequências, identificar os SNPs e compactar os arquivos dos cromatogramas. A visualização dos SNPs foi realizada na interface Gap4, utilizando os dados gerados pelo Pregap4, sua principal função é gerar contigs, permitindo análise clara e rápida das sequências. Ainda nesta interface, os SNPs foram detectados utilizando a opção *detectar SNP candidato* pela inspeção visual na interface *Trace Display*. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa *ClustalW* versão 2.0 (Larkin et al., 2007). Os índices de diversidade nucleotídica (π) das sequências foram estimados utilizando o programa *DnaSP* versão 1.90.1 (Rozas & Rozas, 1999).

Análise fatorial de correspondência (FCA) foi realizada utilizando o programa *Genetix* versão 4.03 (Belkhir et al., 2004), com o intuito de visualizar a separação dos acessos entre as classes de TA baseada nas informações alélicas dos marcadores moleculares SSR, CAPS e STS. O marcador flanqueado pelo conjunto de primers F7-F22-R1-R21 foi retirado da análise por não ter contribuído para a divisão dos acessos entre as classes de TA.

A análise de associação utilizando *Mixed Linear Model* (MLM) foi realizada utilizando o programa *Tassel* versão 2.1 (www.maizegenetics.net). Nesta análise foram incluídas as informações de estruturação genética entre os grupos de acesso com origem diferente e a matriz de parentesco. Para esta análise os alelos raros (frequência inferior a 5%) foram tratados como alelos nulos, como descrito por Breseghello & Sorrells (2006). As análises foram realizadas para quatro grupos de acessos, no primeiro conjunto a análise foi feita com o conjunto total de acessos, 242 acessos da CNAE, no segundo grupo a análise foi feita com os acessos com sistema de cultivo irrigado, totalizando 74 acessos, o terceiro grupo foi composto pelos 92 acessos com sistema de cultivo sequeiro e, por fim, no quarto grupo a análise foi feita com os 24 acessos que compõem a mini coleção. Para os grupos 2 e 3 foram eliminados os acessos que em análise de ancestralidade não apresentaram origem relacionada exclusivamente a um dos dois sistemas de cultivo.

Para a análise de associação com a mini coleção, a análise foi feita utilizando os marcadores SSR, CAPS, STS e os marcadores SNP sequenciados.

Para os marcadores que apresentaram associação significativa com TA e TG, foi realizada a análise de correlação pelo método de Spearman buscando identificar os



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

relação com as duas características, para tanto foi utilizado o programa SAS versão 8 (SAS Institute Inc., USA).

5. RESULTADOS

5.1. DADOS FENOTÍPICOS

Com a construção de histograma, utilizando os dados de TA, foi possível observar que houve maior número de acessos da CNAE com alto TA para os dois anos em que foram avaliados (Figura 8). Foi observado que 102 acessos apresentaram alto TA para 2004 e 129 acessos para 2005. Para as classe intermediária foram observados 96 acessos no ano de 2004 e 62 em 2005. Na classe de baixo TA foram observados 36 e 51 acessos para os anos de 2004 e 2005, respectivamente. Alguns acessos apresentaram diferença nos valores de TA quando comparados os resultados dos dois anos e, com isso, a classificação de TA variou de um ano para outro (Figura 8).

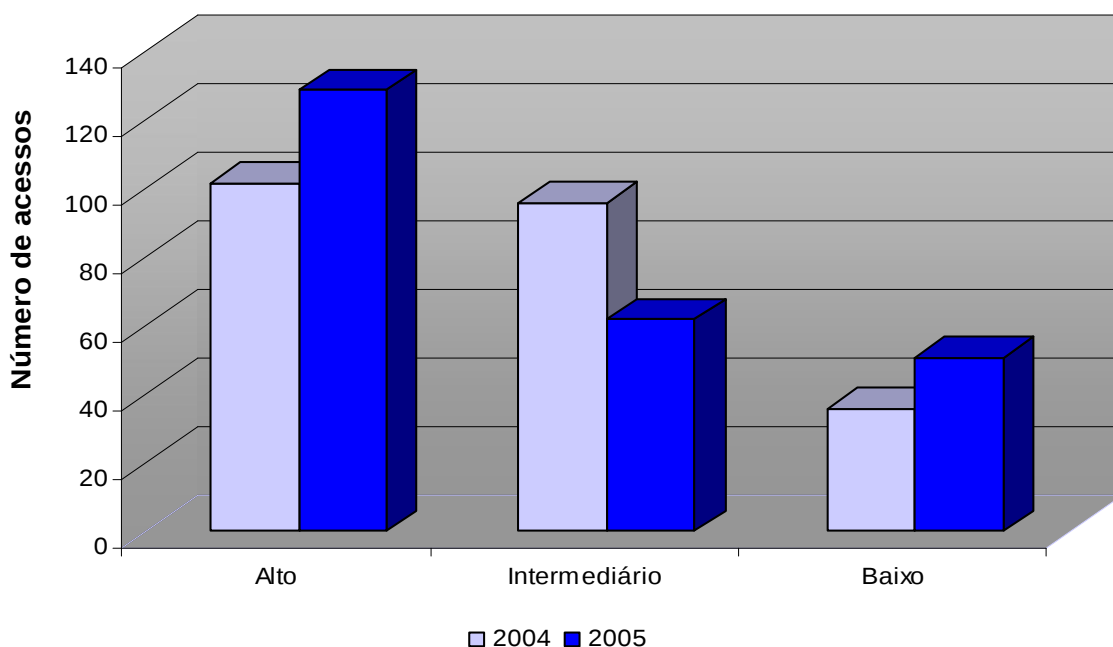


Figura 8. Histogramas com o resultado da análise de teor de amilose dos 242 acessos da CNAE, para os anos de 2004 e 2005

Observado que dos 242 acessos da CNAE a maior parte apresentou TG com valores da classe intermediária, totalizando 150 acessos. Para as classes de alta e baixa TG foi observado quase o mesmo número de acessos, com 49 acessos classificados com TG alta e 43 com baixa TG (Figura 9).

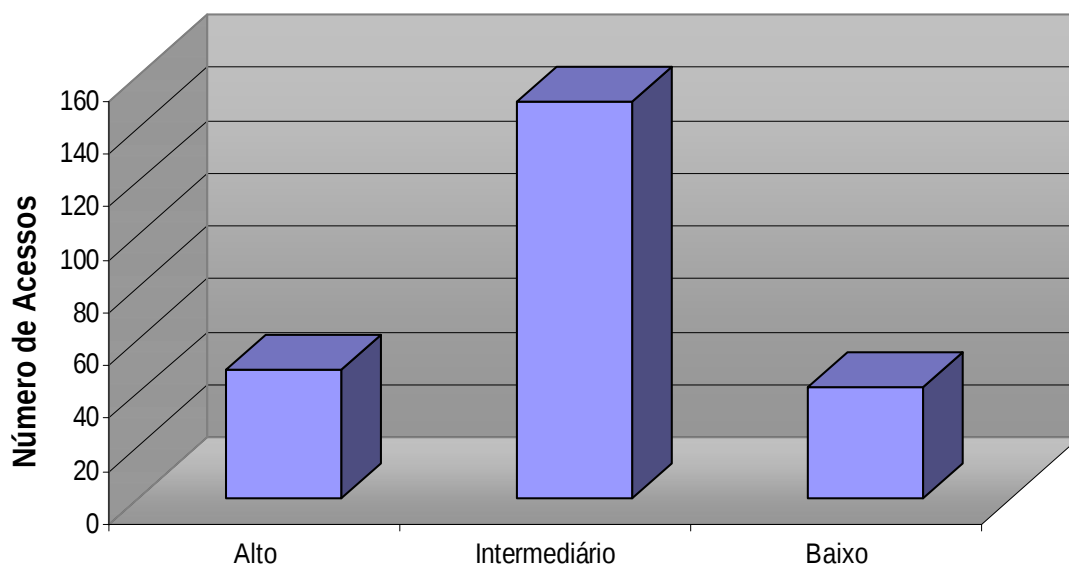


Figura 9. Distribuição dos 242 acessos da CNAE em relação a temperatura de gelatinização, avaliada no ano de 2007

5.2. ANÁLISE MOLECULAR

5.2.1. Análises com marcadores microssatélite

Otimização de PCR para marcadores microssatélites

Para a amplificação dos marcadores SSR desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, foram realizados vários testes buscando otimizar o protocolo da PCR. Foram testadas diferentes concentrações dos reagentes que compõem o *mix* da PCR e diferentes temperaturas de anelamento do *primers* na termociclagem (Tabela 4). Também foram testadas as concentrações de DNA na PCR, variando de 20ng a 40ng.

Para o marcador SS1s a amplificação apresentou melhor resultado com o teste em que foi utilizado a concentração de 35ng do DNA. Para os marcadores SS3s e GB1s os melhores resultados foram obtidos com a concentração de DNA a 20ng. Para os marcadores GL1s e GL3s o melhor resultado foi com concentração de DNA a 40ng (Tabela 4).

mento foram testadas a partir de 50°C, subindo em escala de 2°C até 58°C, temperatura máxima que foi necessária para obter sucesso para todos os marcadores (Tabela 4). Para os marcadores que não apresentaram polimorfismo nos primeiros testes ou não apresentaram boa amplificação, os *primers* foram redesenhados e submetidos a novos testes de amplificação. Somente o marcador SS2.1s não apresentou boa amplificação mesmo após nova síntese, e então foi retirado da análise.

Para os marcadores descritos na literatura, RM190, RM197 e OSR21, foram realizados testes de amplificação somente para confirmar a funcionalidade dos reagentes utilizados e dos protocolos descritos.

Tabela 4. Concentração de DNA e temperatura de anelamento para os marcadores moleculares SSR desenvolvidos na Embrapa Arroz e Feijão e descritos na literatura relacionados ao TA e TG

Marcador	Concentração do DNA	Temperatura de anelamento
SS3s	20ng	54°C
SS1s	35ng	56°C
GL1s	40ng	50°C
GL3s	40ng	58°C
GB1s	20ng	56°C
RM190	20ng	56°C
RM197	20ng	58°C
OSR21	20ng	58°C

Caracterização da variabilidade genética dos acessos da CNAE com base em marcadores microssatélite

Os marcadores moleculares não apresentaram desequilíbrio de ligação significativo, com $p > 0,00075$ (Apêndice D). O número de alelos encontrados nos locos microssatélites variou de 4 alelos, para o marcador SS3s, a 13 para os marcadores GL3s e GL1s, com um total de 73 alelos média de 8,75 alelos/loco. O PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) teve média de 0,63, sendo que o marcador RM190 teve o maior índice com 0,819 e o marcador OS21 apresentou o menor índice com 0,442 (Tabela 5). Considerando que PIC com valores superiores a 0,5 podem ser considerados muito informativos, 0,25 e 0,5 medianamente informativos e inferiores a 0,25 pouco informativos, todos os marcadores avaliados foram informativos, sendo que cinco foram

ente informativos (Tabela 5). Os locos apresentaram baixa probabilidade de identidade, demonstrando que têm grande poder de discriminação dos indivíduos.

Tabela 5. Caracterização de marcadores microssatélites, com número de alelos por loco, Conteúdo de informação polimórfica (*PIC*) e Probabilidade de identidade (*PI*)

Locos	Número de alelos	<i>PIC</i>	<i>PI</i>
RM190	11	0,819	0,043
RM197	5	0,449	0,300
OSR21	6	0,442	0,308
SS3s	4	0,499	0,252
SS1s	8	0,517	0,237
GB1s	10	0,778	0,061
GL3s	13	0,777	0,063
GL1s	13	0,806	0,048
Média	8,75	0,635875	4,611260e ⁻⁰⁰⁸

Comparando a variabilidade dos acessos de acordo com o sistema de cultivo foi observado que, os acessos com sistema de cultivo irrigado apresentaram alta diversidade genética (*He*), com valor igual a 0,72, e maior que a diversidade dos acessos com sistema de cultivo sequeiro, com *He* igual a 0,55 (Tabela 6). Os valores de riqueza alélica (*Ar*) e número médio de alelos (*A*) também foram maiores para o grupo de acessos com sistema irrigado, com valores igual a 7,7 e 7,8, respectivamente, para o grupo com sistema sequeiro os valores foram 7,5 e 7,7, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Variabilidade genética de acessos da CNAE de acordo com o sistema de cultivo, irrigado e sequeiro, utilizando dos marcadores microssatélites

Sistema de cultivo	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>He</i>	<i>Ar</i>
Sequeiro	132	7,7	0,55325	7,526
Irrigado	110	7,8	0,726875	7,783

N- número de acessos; *A*- número médio de alelos; *He*- diversidade genética de Nei (1978); *Ar*- riqueza alélica

Avaliando a existência de alelos privados para os dois de sistema de cultivo, foram encontrados 16 alelos privados entre 6 marcadores Rm190, GL3s, GL1s, SS1s e OSR21 (Tabela 7). Para o marcador RM190 foram encontrados dois alelos privados, um pertencente ao grupo irrigado e um ao grupo sequeiro, assim como para o marcador GB1s. O marcador GL3s apresentou dois alelos privados para o grupo sequeiro e um alelo para o irrigado. O marcador GL1s teve um alelo presente no grupo sequeiro e dois no irrigado. Já o marcador OS21 teve apenas um alelo privado pertencente ao grupo sequeiro. O marcador SS1s apresentou a maior quantidade de alelos privados, com total

sequeiro e três no grupo irrigado. A maior proporção de alelos privados esteve relacionada a acessos com sistema de cultivo irrigado, apresentando 9 alelos. Entre os acessos avaliados, o que apresentou maior número de alelos privados foi o acesso DAWN, com um total de 3 alelos, sendo todos pertencentes ao grupo com sistema de cultivo sequeiro.

Tabela 7. Alelos privados de locos microssatélites presentes nos acessos da CNAE para os sistemas de cultivo irrigado e sequeiro

Locos	Alelos Privados	Frequência dos alelos	
		Irrigado	Sequeiro
RM190	114	-	0,015
	102	0,036	-
OSR21	248	0,028	0,008
SS1s	156	0,009	-
	168	0,028	-
	172	-	0,007
	248	0,028	-
GB1s	162	-	0,015
	168	0,118	-
GL3s	144	-	0,042
	148	0,009	-
	230	-	0,008
GL1s	260	0,029	-
	370	0,029	-
	380	-	0,010
Total	15	9	7

Quando os acessos foram agrupados de acordo com o TA, foram encontrados alelos privados para as classes com baixo e alto TA provenientes dos marcadores Rm190, OSR21, SS1s, GB1s, GL3s e GL1s (Tabela 8). A maior parte dos alelos privados foram encontrados na classe com baixo TA, totalizando cinco alelos. Os alelos do marcador GL3s, que foram exclusivos da classe com baixo TA, tiveram a maior frequência quando comparado com os outros alelos, com valor igual a 0,14.

classe de TA encontrados para acessos da CNAE, provenientes de 1000 microsatélites

Frequência dos alelos				
Locos	Alelos Privados	Baixo	Intermediário	Alto
Rm197	206	0,05128	-	-
SS1s	156	0,01923	-	-
	172	0,02702	-	-
GL3s	148	0,02439	-	-
	230	0,02222	-	-
GL1s	270	-	0,02105	-
	380	-	-	0,02564
Total	7	5	1	1

A análise de alelos privados para as classes de TG detectou presença de sete alelos distribuídos em quatro locos, sendo que RM197 teve um alelo privado e os locos SS1s, GL3s 3 GL1s, apresentaram dois alelos privados (Tabela 9). A maior parte dos alelos privados foram encontrados na classe com alto TG, totalizando cinco alelos.

Tabela 9. Alelos privados dos marcadores microsatélites presentes nos acessos da CNAE para classes de TG

Frequência dos alelos				
Locos	Alelos Privados	Baixo	Intermediário	Alto
Rm190	114	-	-	0,02666
OSR21	248	-	-	0,01388
SS1s	172	0,02667	-	-
GB1s	162	-	-	0,02667
GL3s	148	-	-	0,14085
	230	-	-	0,14085
GL1s	380	0,03703	-	-
Total	7	2	-	5

As frequências dos alelos dos marcadores microsatélites foram avaliadas em três diferentes análises (Apêndice B). Na primeira análise as frequências alélicas foram estimadas para cada classe de TA, foi observado por inspeção visualmente que os marcadores RM190 e GB1s tiveram alelos que apresentaram grandes diferenças nas frequências entre as três classes. Sendo que, os alelos de tamanho menor (pb) tiveram maior frequência na classe com alto TA, os alelos com tamanho intermediário

na classe com baixo TA, e os alelos com maiores tamanhos tiveram maior frequência na classe intermediária. Os marcadores SS1s, GL1s, RM197, OSR21 e GL3s também apresentaram alelos com frequências maiores para uma das classes de TA, não havendo relação do tamanho do alelo com a frequência entre as classes (Apêndice B).

Na segunda análise as frequências foram estimadas de acordo com as três classes de TG. Nesta análise foi observado que os alelos do loco RM190 também apresentaram maior diferença nas frequências entre as três classes, mas não foram relacionadas com o tamanho dos alelos (Apêndice B). Os locos RM197, OSR21, GB1s, GL3s e GL1s, também apresentaram alelos com diferença nas frequências de acordo com as classes de TG (Apêndice B).

A terceira e última análise avaliou as frequências dos alelos de acordo com o sistema de cultivo, em que foi observado que todos os locos tiveram alelos que apresentaram maior frequência para um dos sistemas de cultivo (Apêndice B).

Divergência genética

Na análise de similaridade genética, com base no dendrograma, foram identificados 22 acessos com coeficiente de aglomeração 0.00, distribuídos em 10 grupos distintos. Os acessos presentes em cada um destes grupos apresentaram distância genética zero para este conjunto de locos, indicando que possuem alta similaridade.

Com o coeficiente de aglomeração 0.026 foram identificados três grandes grupos de acessos (Figura 10 e Apêndice C). O primeiro grupo, formado por 77 acessos, teve a maior parte dos acessos, 79,2%, com sistema de cultivo irrigado, já o terceiro grupo, com 84 acessos, teve a maior parte dos acessos, 78,6%, com sistema de cultivo sequeiro, e o segundo grupo localizando entre os dois grupos, o percentual de acessos para cada sistema de cultivo foi similar.

Os três grupos também apresentaram diferenças quanto ao TA. Para o primeiro grupo, 12% dos acessos teve TA intermediário, 10% dos acessos com TA baixo, 38,6% dos acessos com TA alto e 38,9% dos acessos foram classificados com alto TA em um dos dois anos (2004 e 2005) que foram feitas as análises, com isso, neste grupo 76,8%, apresentam alto TA. No segundo grupo, 35,8% dos acessos apresentaram TA baixo, 25,6% TA intermediário, 12,8% tiveram TA alto e 24% dos acessos tiveram variação nos valores de TA entre os dois anos da avaliação. No terceiro grupo, 36,9% dos acessos apresentaram TA intermediário, 15,4% TA alto, 41,6% dos acessos tiveram variação nos valores de TA entre os dois anos de análise, sendo todos com variação entre as classes

... somente 5,95% dos acessos apresentaram TA baixo, sendo assim, 78,5% dos acessos possuem TA intermediário.

Para os dados de TG, não houve relação da divisão dos grupos do dendrograma com as classes de TG.



Figura 10. Dendrograma com 242 acessos da CNAE, construído com dados de genotipagem dos marcadores SSR, com formação de três grupos baseados no coeficiente de aglomeração de 0,026

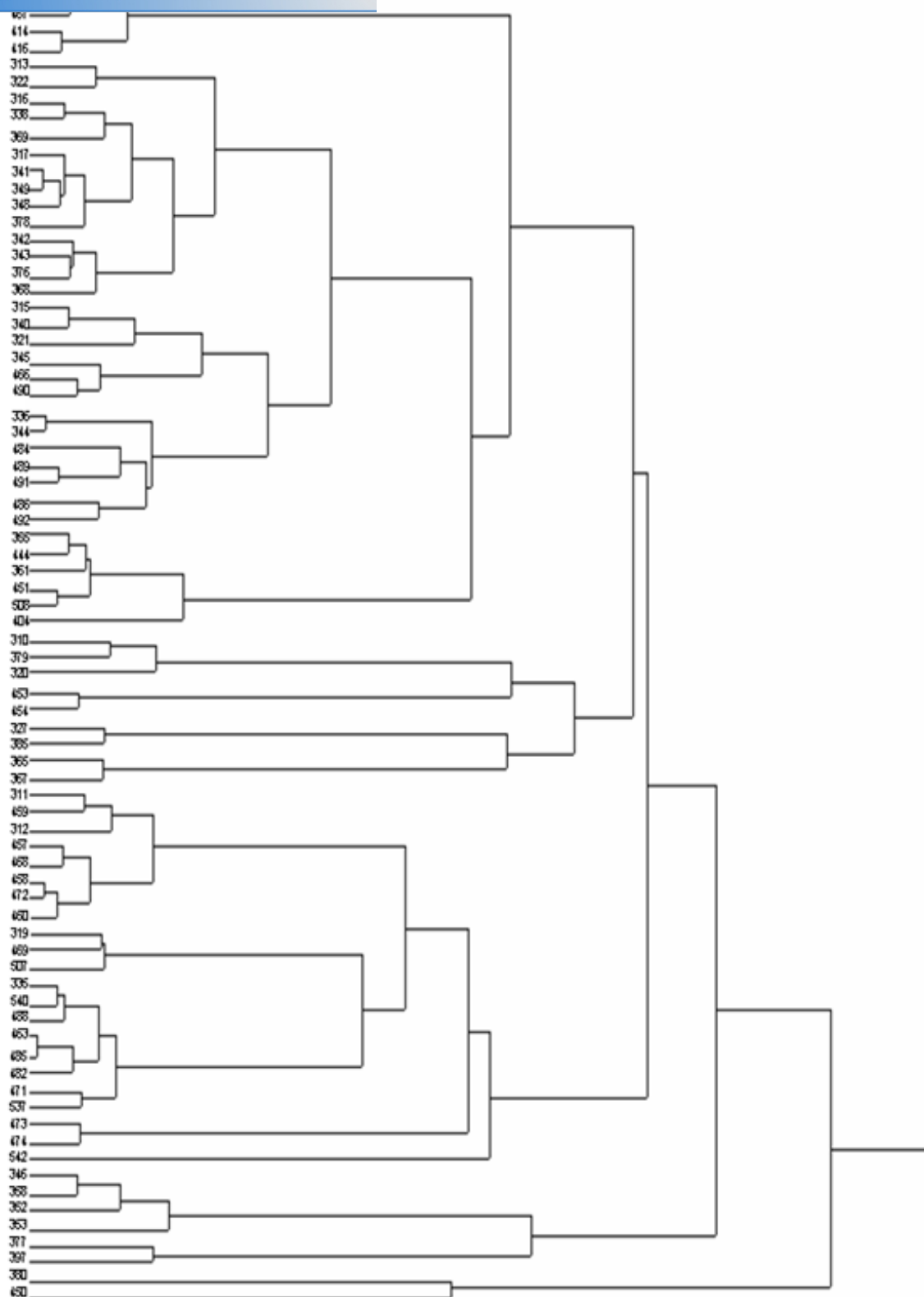


Figura 11. Detalhe do dendrograma da figura 10 realçando o Grupo 1,mostrando os acessos da CNAE que o compõe

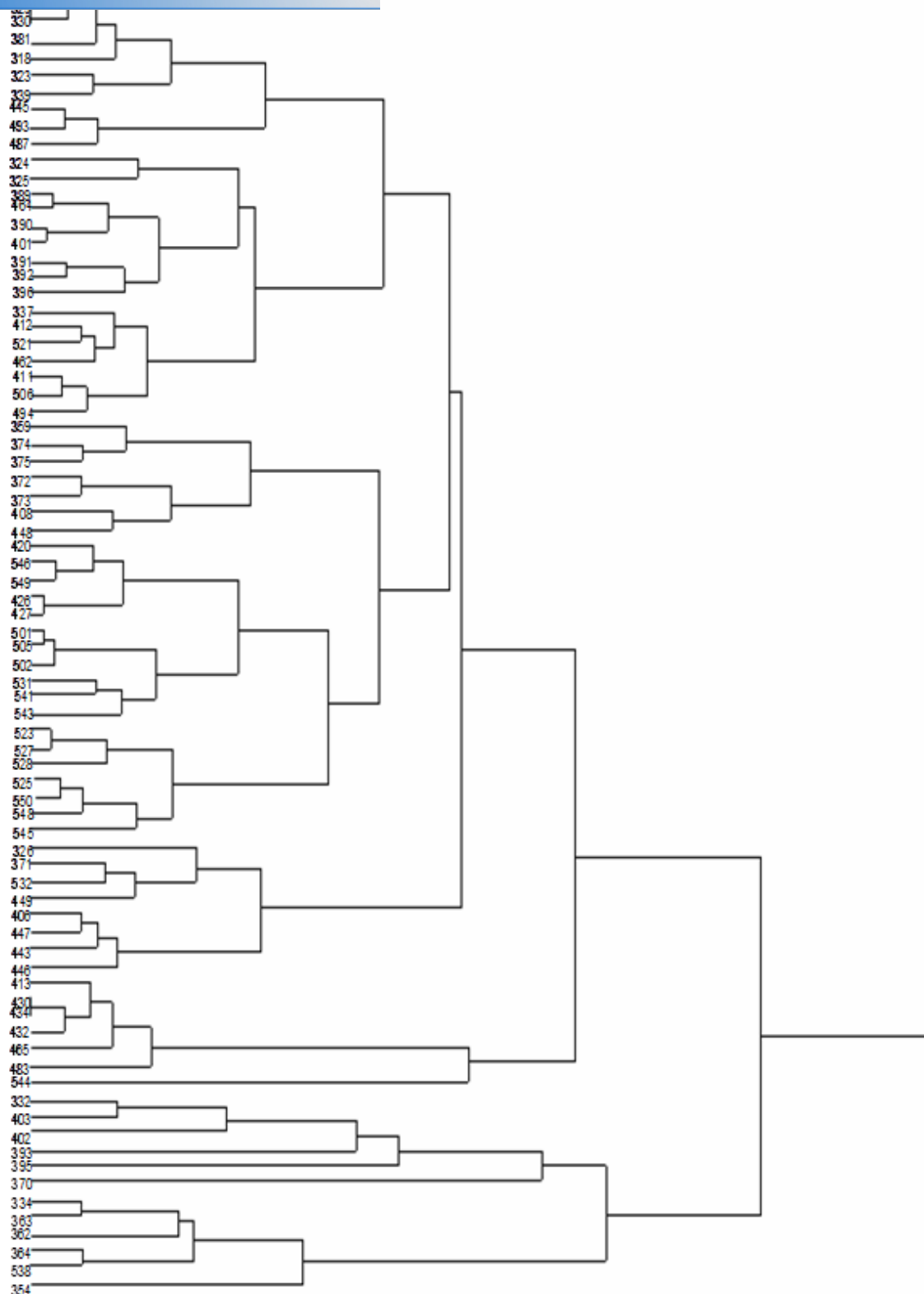


Figura 12. Detalhe do dendrograma da figura 10 realçando o Grupo 2, demonstrando os acessos da CNAE que o compõe

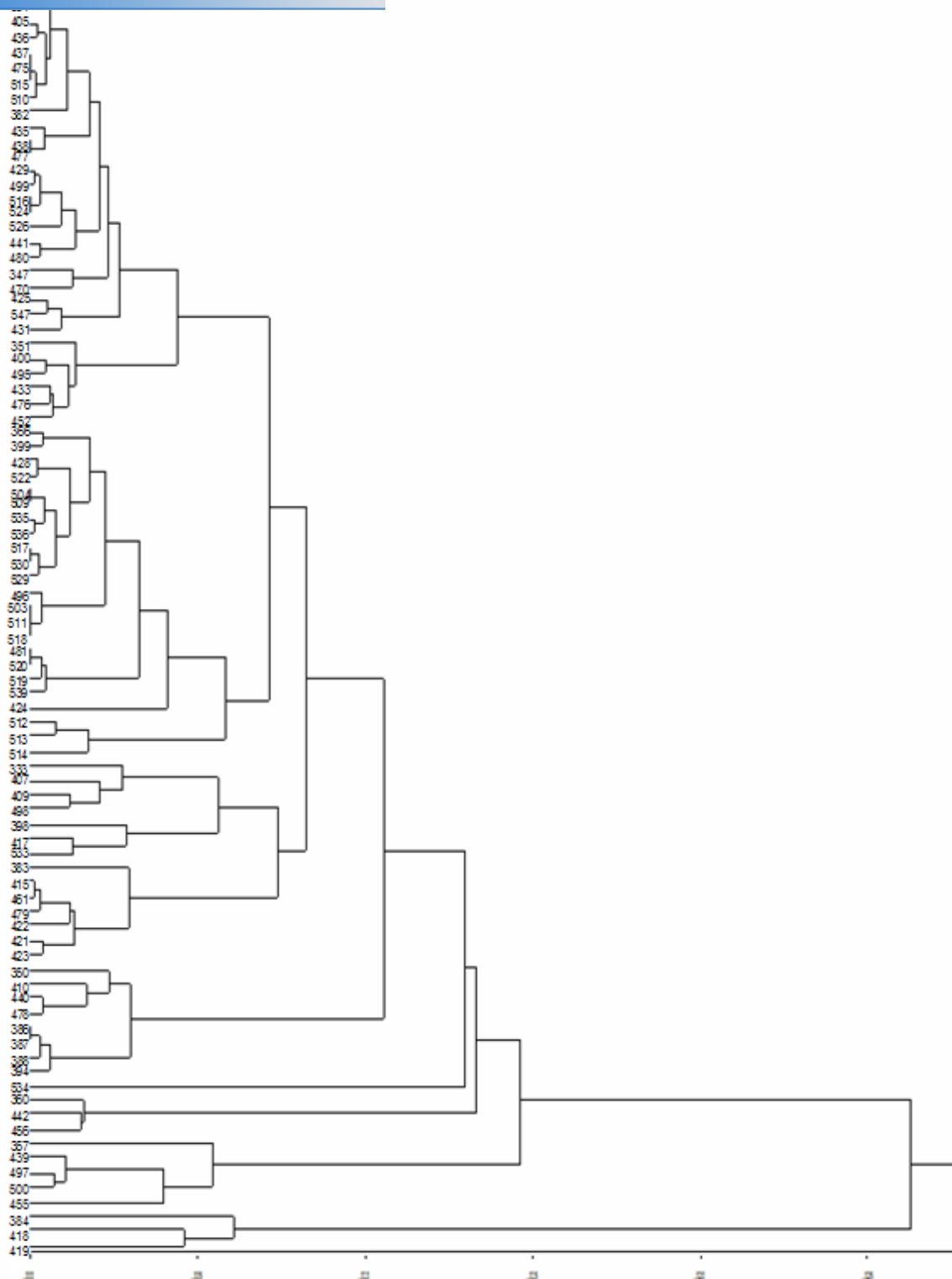


Figura 13. Detalhe do dendrograma da figura 10 realçando o grupo 3, demonstrando os acessos da CNAE que o compõe

Amplificação do conjunto de pares de *primers* F7-F22-R1-R21

Para os dois de pares *primers* (F7-R1) e (F22-R21), descritos por Bao et al., 2006b, foram feitos ajustes no protocolo descrito pelos autores, pois as amplificações seguindo o protocolo descrito não apresentaram os padrões esperados. Os resultados foram satisfatórios (Figura 14) quando a amplificação foi realizada com o Kit de reação comercial Qsolution (Qiagen). Após os ajustes foi possível observar, em gel de agarose, as duas bandas referentes aos dois SNPs, sendo que a banda com 542 pb é referente ao SNP GC e a banda com 832pb é referente ao SNP TT.

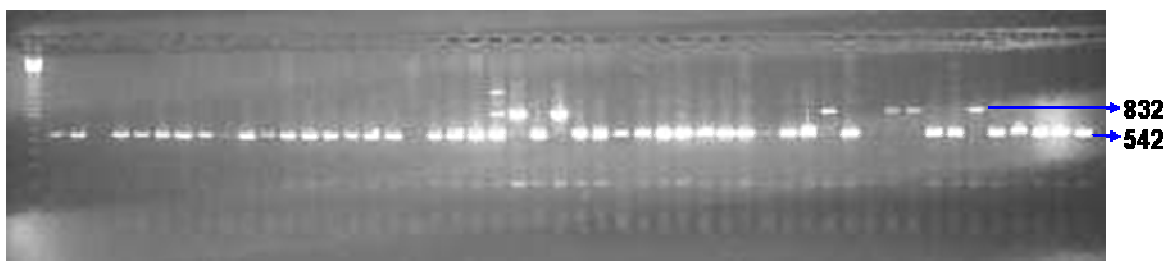


Figura 14. Gel de agarose com amplificação do conjunto de *primers* F7-F22-R1-R21, visualizando o polimorfismo esperado de acordo com a literatura

Otimização de PCR para amplificação dos marcadores CAPS, STS e SNP

Para os marcadores CAPS (W2R e SBE3) e o marcador STS (SBE1), foram realizados testes seguindo protocolos já descritos na literatura, buscando apenas confirmar o funcionamento do protocolo e o dos reagentes. Sendo assim, não foi necessário fazer ajustes nas concentrações dos reagentes do mix de PCR e nos padrões de amplificação (Tabela 10).

Tabela 10. Informações da amplificação dos marcadores CAPS, STS e F7-F22-R1-R21

<i>Primer</i>	Temp. anelamento (°C)	<i>Primers</i> (> M)	DNA (ng)
W2R	56	0,4	20
SBE1	58	0,4	20
SBE3	58	0,4	20
F7-F22-R1-R21	60	0,4	3

Para os marcadores SNP que tiveram os *primers* desenhados no laboratório de biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão, a otimização das PCR foram realizadas por meio de testes com diferentes temperaturas de anelamento, concentrações de *primers* e

estes, foi possível padronizar as concentrações dos reagentes para todos os marcadores.

Também foram realizados testes para otimização das reações de sequenciamento em que foi utilizado o kit comercial *BigDye*. Para estas reações foram ajustadas as concentrações do produto de PCR amplificado (DNA), concentração de *primers* e concentração do Kit *BigDye* (Figura 16 e Tabela 11). As concentrações do produto da PCR que apresentaram melhor resultado variaram entre 5ng e 10ng, a concentração dos *primers* variou entre 3,2μM a 6,4μM, e a concentração do Kit *BigDye* variou entre 0,6 e 1μl. Os marcadores CHOL e SS2.2 não apresentaram bom padrão de amplificação para esta etapa mesmo após a realização de vários testes, com isso eles foram retirados das análises.

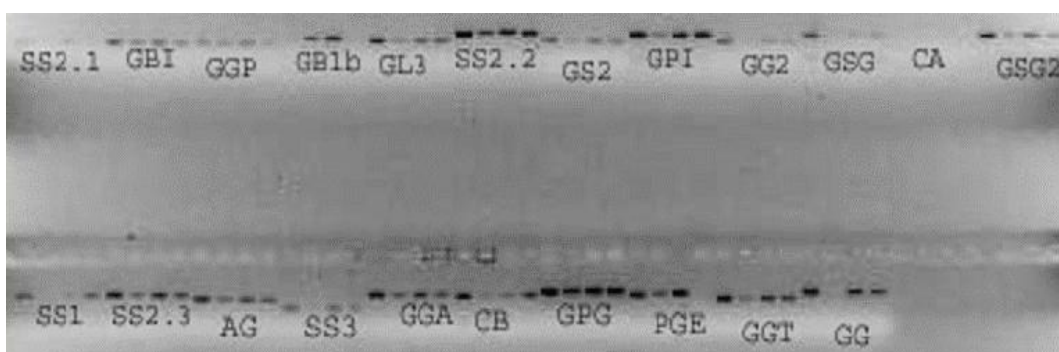


Figura 15. Testes de amplificação de PCR para os marcadores SNP com temperatura de anelamento a 56°C. Visualizando os marcadores que apresentaram boa amplificação e os que não amplificaram bem

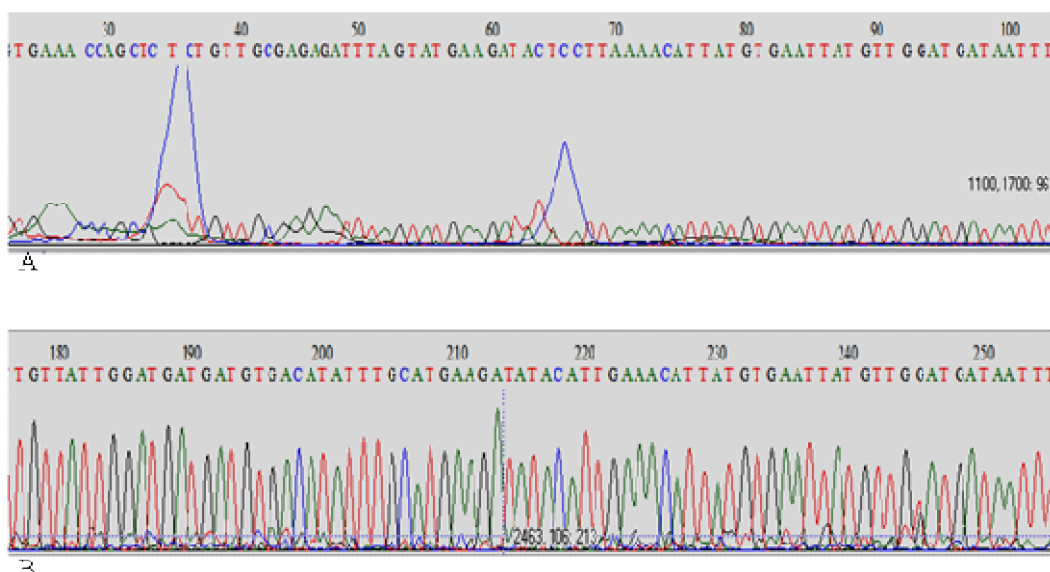


Figura 16. Resultado de sequenciamento do marcador CA-2 antes e após otimização da reação de sequenciamento. A: sequenciamento do acesso IR-50 antes do ajuste da reação. B: Sequenciamento do IR-50 após o ajuste da reação

quênciamento de marcadores SNP, com respectivas
temperatura de anelamento, concentrações de *primers* e concentrações de
fragmentos amplificados, *primer (forward)* e kit *Bigdie*

Marcador	Temp. de anelamento (°C)	PCR(ng)	Forward(µ M)	Kit <i>Bigdie</i> (µ L)
AG	56	5	3,2	0,6
CA-2	56	5	6,4	0,6
CB	52	5	3,2	0,6
CHOL	52	10	6,4	1
CYTO1	58	10	6,4	1
CYTO2	56	5	3,2	0,6
CYTO3	56	5	3,2	0,6
GB1	56	5	3,2	0,6
GB1b	56	5	3,2	0,6
GG	56	5	3,2	0,6
GG2	52	5	3,2	0,6
GGA	56	5	3,2	0,6
GGP	54	5	3,2	0,6
GGT	56	5	3,2	0,6
GL3	54	10	3,2	1
GPG	56	5	3,2	0,6
GPI	56	5	3,2	0,6
GS2	54	5	3,2	0,6
GSG	52	5	3,2	0,6
GSG2	54	5	3,2	0,6
PGE	56	5	3,2	0,6
SS1	52	10	6,4	1
SS2.3	58	5	3,2	0,6
SS3	54	10	6,4	1

Frequências alélicas dos acessos da CNAE para os marcadores STS, CAPS e F7-F22-R1-R21

As frequências alélicas dos locos STS e CAPS foram estimadas para as três classes de TG e TA (Tabela 12). Como resultado, foi observado que no loco W2R o alelo 220 apresentou maior frequência para as classes de alto e intermediário TA com valores de 0,912 e 0,862, respectivamente, e o alelo 380 apresentou maior frequência na classe de baixo TA com frequência de 0,676. O alelo 295 do loco SBE3 apresentou maior frequência, 0,438, nos acessos com TA intermediário, enquanto que para as classes de TA alto e baixo apresentou as frequências de 0,347 e 0,385, respectivamente. Para o marcador F7-F22-R1-R21 o alelo 542 apresentou frequência maior na classe

mente o alelo 832 teve menor frequência nesta classe. Para as classes de TG, no loco W2R o alelo 220 apresentou maior frequência nas classes com alta e intermediária TG, o mesmo foi observado para o marcador SBE1 (Tabela 12). O conjunto F7-F22-R1-R21 apresentou maior diferença na frequência dos alelos entre as classes com alta e baixa TG (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência alélica dos locos SNP, CAPS e STS nos acessos da CNAE, para as classes de TA e TG

Marcador	Alelo(pb)	Freq. Alélica TA			Freq. Alélica TG		
		Baixo	Int.*	Alto	Baixa	Int.*	Alta
W2R	220	0,324	0,862	0,912	0,833	0,827	0,622
	380	0,676	0,138	0,088	0,167	0,173	0,378
SBE3	295	0,385	0,438	0,347	0,475	0,415	0,431
	510	0,615	0,562	0,653	0,525	0,585	0,569
SBE1	548	0,886	0,972	1,000	1,00	0,985	0,896
	882	0,114	0,028	0,000	0,00	0,015	0,104
F7-F22-R1-R21	542	0,718	0,930	0,783	0,865	0,887	0,372
	832	0,282	0,070	0,217	0,135	0,113	0,628

Análise de marcadores SNP sequenciados

A partir do sequenciamento de 26 regiões de genes envolvidos na biossíntese do amido, foram detectados polimorfismo SNP em dez marcadores, CA-2; CB; CYTO3; GB1b; GGA; GG; GL3; GSG2; GSG e PGE. A detecção dos SNPs foi realizada utilizando o programa Staden Package, no módulo *Trace Display* foi possível visualizar a posição dos SNPs em cada acesso (Figura 17).

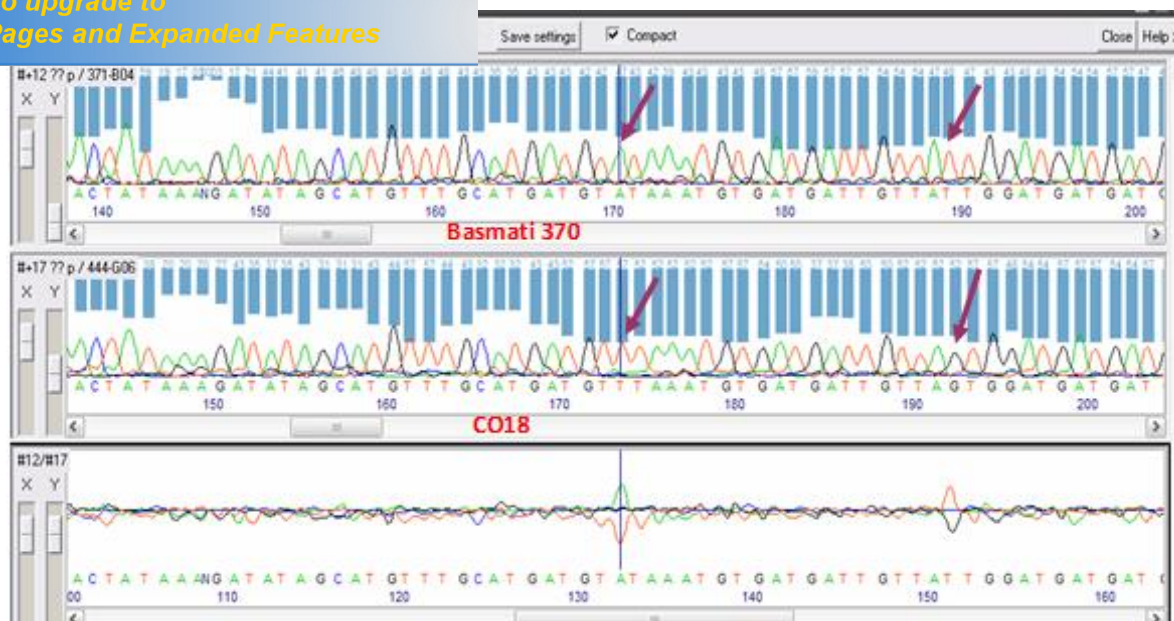


Figura 17. Eletroferograma com parte de fragmento amplificado no loco CA-2, com a detecção dos SNP A/T e G/T nos acessos Basmati 370, tendo as bases (A) no primeiro SNP e (T) no segundo, e CO18 com as bases (T) no primeiro SNP e (G) no segundo SNP

Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram compatíveis com o esperado, quando comparado com o tamanho da sequência no banco de dados de sequência do arroz. A posição dos SNPs encontrados também foi compatível com a dos SNPs esperados, porém, em alguns fragmentos foram identificados SNPs que não estavam presentes no banco de dados (Tabela 13).

O loco CA-2 apresentou o maior número de SNP encontrado (9 SNP/Indel) em relação a todos os marcadores sequenciados, sendo que 8 dos SNP encontrados não eram esperados. Os polimorfismos deste loco foram baseados em uma inserção e sete SNP, um SNP esperado não foi encontrado (Tabela 13). Para o loco PGE foi identificado 8 SNP/Indel, sendo que 2 inserções não estavam presentes no banco de dados e um SNP esperado não foi encontrado (Tabela 13). Para o loco GGA era esperado um SNP, porém, além deste foi identificado um segundo SNP (Tabela 13). Já nos locos GSG e GL3 foi encontrado quantidade de SNP menor que o esperado (Tabela 13). Para o loco GSG esperava-se 3 SNP e foram identificados apenas 2 (Tabela 13). Para o loco GL3 apenas um dos dois SNP esperados foi identificado (Tabela 13). Para os locos CB, CYTO3, GB1b, GG, e GSG2 foram encontrados exatamente os SNP esperados (Tabela 13).

O número de SNP e Indel encontrados totalizaram 31 mutações, sendo 4 indels e 24 SNPs. Dos SNPs encontrados 10 foram substituições entre bases purinas (A-G), 7

10 substituições entre bases purinas e pirimidinas

(Tabela 13).

A diversidade nucleotídica, que expressa o grau de divergência entre as sequências de cada loco, apresentou valores baixos, com média de 0,0054. O marcador que apresentou a maior diversidade nucleotídica entre suas sequências foi o CA-2 com 0,017, que também teve o maior fragmento (300 pb), a menor diversidade nucleotídica foi encontrada no marcador CB, com 0,003 (Tabela 13).

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

equenciados, com respectivos tamanho, diversidade nucleotídica e polimorfismo encontrado e suas posições

Marcador	Tamanho(pb)	Diversidade Nucleotídica (°)	SNP/Indel Esperado	SNP/Indel Encontrado	Posição (pb)
CA-2	300	0,017	-	cccc/c	19
-	-	-	c/t	c/t	28
-	-	-	-	a/g	70
-	-	-	-	c/t	94
-	-	-	-	a/t	163
-	-	-	g/a	-	175
-	-	-	-	a/c	201
-	-	-	-	c/t	226
-	-	-	-	g/t	245
CB	150	0,003	a/g	a/g	43
-	-	-	-	tata/---	51
CYTO3	230	0,005	c/t	c/t	91
GB1b	200	0,007	a/g	a/g	45
-	-	-	a/g	a/g	80
-	-	-	c/t	c/t	81
GG	220	0,004	g/t	g/t	47
-	-	-	a/c	a/c	49
GGA	220	0,004	a/t	a/t	67
-	-	-	-	a/g	109
GL3	120	0,008	c/a	-	50
-	-	-	c/t	c/t	76
GSG	240	0,006	t/c	-	64
-	-	-	g/a	g/a	151
-	-	-	g/a	g/a	194
GSG2	195	0,006	g/t	g/t	55
-	-	-	t/c	t/c	87
PGE	200	0,014	t/g	t/g	37
-	-	-	-	cttacacataata/-	25
-	-	-	a/g	a/g	163
-	-	-	t/c	-	164
-	-	-	t/g	t/g	185
-	-	-	-	t	186
-	-	-	-	a	187
GG2	130	0,0037	g/a	-	-
-	-	-	a/g	-	-
-	-	-	t/c	-	-
-	-	-	g/a	-	-
-	-	-	-/aa	-	-
-	-	-	g/a	-	-
-	-	-	g/c	-	-
-	-	-	t/g	-	-
-	-	-	t/g	-	-

sequenciados, com respectivos tamanho, diversidade nucleotídica e polimorfismo encontrado e suas posições

Marcador	Tamanho (pb)	Diversidade nucleotídica (°)	SNP/Indel Esperado	SNP/Indel Encontrado	Posição (pb)
AG	150	0,0036	cc/ccc	-	-
CYTO1	470	0,0001	t/c	-	-
	-	-	a/-	-	-
	-	-	a/acgtcgga	-	-
GPI	250	0,0080	g/c	-	-
GGP	-	0,0014	a/t	-	-
	-	-	g/a	-	-
	-	-	c/t	-	-
	-	-	a/c	-	-
GGT	175	0,0051	a/g	-	-
	-	-	t/g	-	-
	-	-	c/g	-	-
	-	-	a/g	-	-
	-	-	a/t	-	-
	-	-	g/a	-	-
	-	-	a/c	-	-
GS2	180	0,0073	a/g	-	-
CYTO2	470	0,0014	g/a	-	-
	-	-	g/t	-	-
	-	-	t/c	-	-
	-	-	t/a	-	-
	-	-	ct/ctctcct	-	-
	-	-	g/t	-	-
	-	-	a/c	-	-
	-	-	t/c	-	-
	-	-	t/g	-	-
	-	-	g/a	-	-
	-	-	g/c	-	-
GB1	180	0,0011	c/t	-	-
	-	-	a/t	-	-
	-	-	g/a	-	-
GPG	250	0,0010	g/c	-	-
SS2.1	165	0,0030	g/a	-	-
SS3	100	0,0024	t/a	-	-
	-	-	c/t	-	-
SS2.3	260	0,0025	g/c	-	-
	-	-	c/a	-	-
	-	-	c/t	-	-
	-	-	c/g	-	-
	-	-	c/a	-	-
	-	-	c/t	-	-
SS1	220	0,0155	a/g	-	-
Média	-	0,0054	-	-	-

Para a análise de associação utilizando os 242 acessos, foram encontradas associações significativas para 4 marcadores (Tabela 14). Os marcadores F7-F22-R1-R21, RM190 e W2R apresentaram associação com as duas características (TA e TG), e o marcador GB1s apenas com TA. O marcador F7-F22-R1-R21 explicou 38% e 60% da variação fenotípica do TA para os anos 2004 e 2005, respectivamente, e para TG explicou 66% da variação. Localizados no gene *Waxy*, os marcadores GB1s e RM190 explicaram 56% da variação de TA em 2004, 72% e 74%, respectivamente, para 2005. Para TG apenas RM190 apresentou associação significativa, explicando 55% da variação. Já o marcador W2R, também presente no gene *waxy*, explicou para TA 68% no ano de 2004 e 82% em 2005, para TG explicou 58%.

Tabela 14. Associação de marcadores moleculares com TA e TG para 242 acessos, com respectivos coeficientes de determinação (R^2)

Marcador	Coeficientes de determinação (R^2)		
	TA2004	TA2005	TG
F7-F22-R1-R21	0,389	0,608	0,661
GB1s	0,565	0,0725	-
RM190	0,569	0,746	0,553
W2R	0,681	0,826	0,581

Para os acessos com sistema de cultivo irrigado, foi encontrado associação para 5 marcadores, W2R, RM190, F7-F22-R1-R21, GB1s, SBE3, (Tabela 15). Os marcadores W2R, RM190 e GB1s apresentaram associação significativa com TA, explicando 56%, 44% e 41% da variação para os dados de 2004 respectivamente, e 63%, 60% e 51% respectivamente, para o ano de 2005. O marcador F7-F22-R1-R21 teve associação com TG, explicando 62% da variação, e para TA do ano de 2004 explicando apenas 18% da variação. O marcador SBE3 teve associação com TG e explicou 55% da sua variação (Tabela 15).

Para os acessos com sistema de cultivo sequeiro, foi observada associação com seis marcadores, W2R, RM190, F7-F22-R1-R21, GB1s, SS3s e SS1s, (Tabela 15). O marcador GB1s teve associação com TA, explicando 47% e 55% da variação dos anos de 2004 e 2005, respectivamente, e com TG explicando 49% da variação. O marcador W2R foi associado às duas características, para TA do ano de 2004 explicou 31% da variação e para 2005 explicou 38% assim como para TG. O conjunto F7-F22-R1-R21 teve associação apenas com TG explicando 50% de sua variação, assim como os

explicaram 38% e 40% da variação fenotípica. O marcador RM190 teve associação apenas com TA sendo que para 2004 explicou 49% da variação e para 2005 explicou 60% (Tabela 15).

Tabela 15. Associação dos marcadores moleculares com TA e TG para acessos com sistema de cultivo irrigado e sequeiro, com respectivos coeficientes de determinação (R^2)

Marcador		Coeficientes de determinação (R^2)		
		TA2004	TA2005	TG2007
Irigado	GB1s	0,415	0,510	-
	F7-F22-R1-R21	0,184	-	0,623
	RM190	0,444	0,609	-
	W2R	0,569	0,638	-
	SBE3	-	-	0,509
Sequeiro	GB1s	0,479	0,551	0,491
	F7-F22-R1-R21	-	-	0,507
	RM190	0,498	0,604	-
	W2R	0,316	0,393	0,382
	SS3s	-	-	0,381
	SS1s	-	-	0,403

Para a mini coleção, a análise de associação foi feita utilizando os marcadores SSR, CAPS, STS e os marcadores SNP sequenciados. Como resultado, foi encontrada associação entre o marcador W2R com TA para os dois anos de análise, explicando 71% da variação para 2004 e 72% para 2005. O marcador SNP CA-2 foi associado com TA para o ano de 2004, explicando 51% da variação, o marcador SNP PGE apresentou associação com TA para os dois anos, explicando 50% e 52% da variação para 2004 e 2005, respectivamente, e com TG explicando 43% da variação (Tabela 16).

res moleculares com TA e TG para 24 acessos, com respectivos coeficientes de determinação (R^2)

Marcador	Características		
	TA2004	TA2005	TG2007
W2R	0,711	0,726	-
CA-2	0,518	-	-
PGE	0,507	0,524	0,432

A análise fatorial de correspondência demonstrou que com os dados moleculares dos marcadores SSR, STS e CAPS para os 242 acessos (Figura 18), foram formados três grupos de acessos compatíveis com as classes de TA, sendo que o grupo com pontos amarelo é referente a alto TA, os pontos em branco são referentes a TA intermediário e os pontos em azul são referentes ao baixo TA. Foi observado também maior separação entre os grupos amarelo e azul, e menor definição dos grupos em azul e branco, indicando pouca distinção entre os acessos com baixo e intermediário TA. Para TG a análise fatorial de correspondência, utilizando os mesmos marcadores, não formou grupos de acessos compatíveis com as classes da característica.

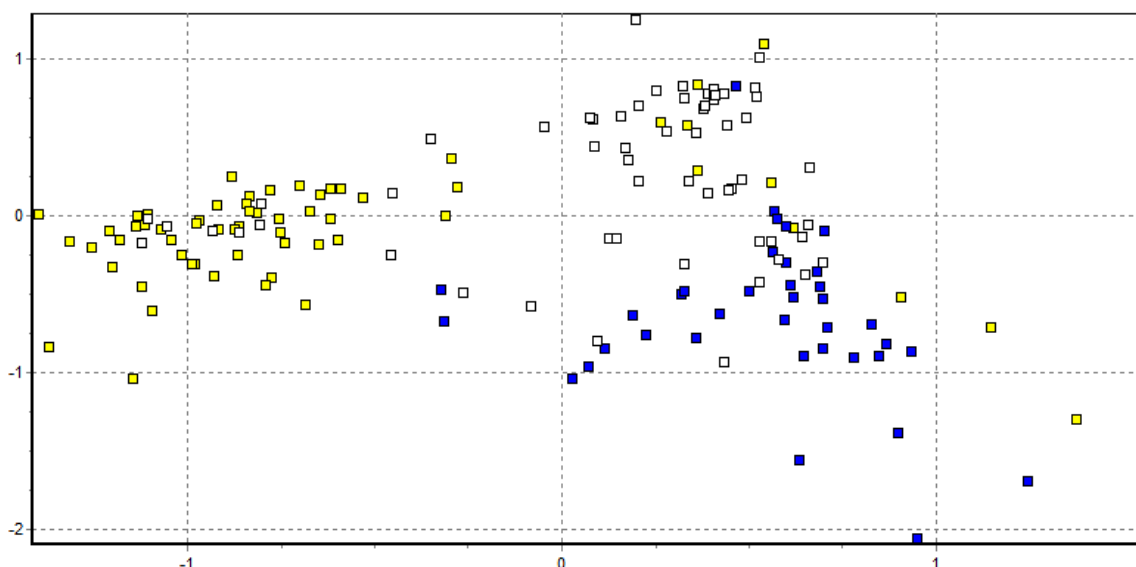


Figura 18. Distribuição dos acessos da CNAE entre classes de TA. Em amarelo estão os acessos com a classe de TA alto, em azul os acessos da classe TA intermediário e em branco os da classe TA baixo

A análise fatorial de correspondência com a mini coleção foi realizada utilizando os dados dos marcadores SSR, CAPS, STS e os SNPs sequenciados (Figura 19). Os SNPs presente nos marcadores foram agrupados em haplótipos, cada hapótipo recebeu uma numeração com três dígitos e esse valor foi duplicado visando transformar os dados

, viabilizando assim a realização desta análise. Como resultado foi observado a formação de dois grupos separando os acessos com alto e baixo TA, os acessos da classe de TA intermediário ficaram distribuídos entre os dois grupos.

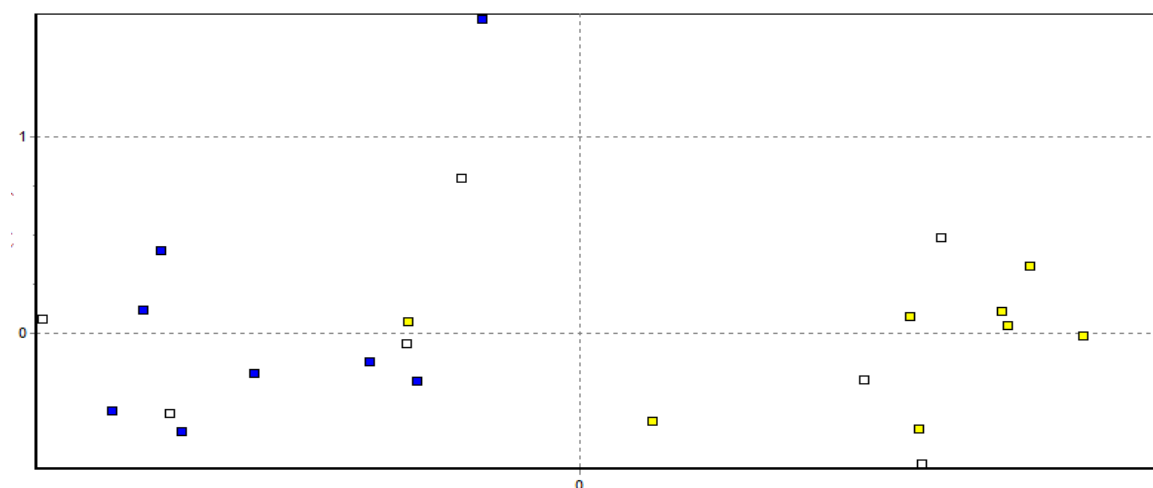


Figura 19. Distribuição espacial de 24 acessos da CNA entre as classes de TA. Em amarelo estão os acessos com a classe de TA alta, em azul os acessos da classe TA intermediária e em branco os da classe TA baixa

Com análise de correlação utilizando teste de Spearman ($p < 0,05$), foi testada a correlação de cada alelos dos locos SSR, STS CAPS e F7-F22-R1-R21, com as classes de TA e TG, podendo identificar os alelos que melhor explicam a variação fenotípica dos 242 acessos da CNAE (Tabela 17). A tabela lista apenas os alelos que apresentaram correlação positiva. Como resultado, observou-se que o loco que tiveram correlação mais alta foi o W2R para TA seguido pelo RM190 e GB1s. Com esta análise não foi possível encontrar muitos alelos correlacionados com as classes de TG, mesmo os alelos do marcador F7-F22-R1-R21 que de acordo com a literatura está relacionado a esta característica.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

SSR, CAPS, STS e F7-F22-R1-R21 com correlação
significativa com as classes de TA e TG, baseado no teste de Spearman

Marcador	Alelo	TA04			TA05			TG07	
		alto	Int.	baixo	alto	Int.	baixo	alto	baixo
W2R	220	0,330	-	-	0,300	0,254	-	-	-
	380	-	-	0,681	-	-	0,823	-	-
SBE3	295	-	-	-	-	0,142	-	-	-
	510	-	-	-	0,196	-	-	-	-
SBE1	882	-	-	0,135	-	-	0,220	-	-
F7-F22-R1-R21	542	-	-	-	-	0,250	-	-	-
	832	-	-	-	-	-	0,174	-	-
RM 190	108	0,192	-	-	0,387	-	-	-	-
	110	0,223	-	-	0,260	-	-	-	-
	114	-	-	-	0,134	-	-	-	-
	120	-	-	0,401	-	-	0,512	-	-
	122	-	-	0,310	-	-	0,264	-	-
	124	-	-	0,200	-	-	0,26	-	0,180
	126	-	0,192	-	-	-	-	-	-
	128	-	0,150	-	-	0,461	-	-	-
RM 197	198	-	-	-	-	-	0,168	-	-
	202	-	0,183	-	-	0,316	-	-	-
	204	-	-	-	0,325	-	-	-	-
	206	-	-	-	0,135	-	-	-	-
	218	0,164	-	-	0,272	-	-	-	-
OSR21	216	-	-	-	-	-	0,226	-	-
SS3s	248	-	-	-	-	-	-	-	0,147
	154	-	-	-	0,194	-	-	-	-
SS1s	164	-	-	-	-	0,242	-	-	-
	166	-	-	-	0,127	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	-	-	0,139	-
	176	-	-	-	0,138	-	-	-	-
	182	-	-	-	0,180	-	-	-	-
GB1s	156	0,255	-	-	0,340	-	-	-	-
	158	0,183	-	-	0,371	-	-	-	-
	162	-	-	-	0,130	-	-	-	-
	166	-	-	0,172	-	-	0,221	-	0,158
	168	-	-	0,153	-	-	0,300	-	-
	172	-	-	0,351	-	-	0,400	-	-
	176	-	0,140	-	-	0,463	-	-	-
GL3s	144	-	-	-	0,136	-	-	-	-
	150	-	-	-	0,142	-	-	-	-
	154	0,162	-	-	-	-	-	-	-
	156	-	-	-	-	-	-	0,133	-
	158	-	-	-	-	-	-	-	0,165
	170	-	-	-	-	-	-	-	0,142
	200	-	-	0,125	-	-	-	-	-
	260	-	-	-	0,132	-	-	-	-
GL1s	280	-	-	0,180	-	-	0,145	-	-
	300	-	-	0,141	-	-	0,213	-	-
	320	-	0,215	-	-	0,220	-	-	0,120
	350	-	-	-	0,192	-	-	-	-
	380	-	-	0,153	-	-	0,137	-	-

6. DISCUSSÃO

As características físico-químicas do amido exercem grande influência na qualidade do grão do arroz após o cozimento, entre estas características estão o TA e a TG. Para a CNAE foi encontrado maior percentual de acessos com TG intermediária, indicando que a temperatura necessária para o cozimento do grão seja em torno de 69°C e 73°C (Jennings et al., 1979).

Para TA foi encontrado maior percentual de acessos com os altos valores de amilose. Para alguns acessos foi observada variação nos valores desta característica entre os dois anos de análise. Estas diferenças podem estar relacionadas à influência do ambiente. Estudos indicaram que o ambiente pode ter alguma influência sobre as características do grão do arroz (Resurreccion et al., 1977; Asaoka et al., 1984, 1985). Foi observado em arroz waxy que a temperatura atmosférica pode influenciar os valores de TA, em que alta temperatura foi relacionada à baixo TA (Larkin & Park, 1999; Chen et al., 2008).

Caracterizar os acessos de uma coleção nuclear é de grande importância, evita redundâncias e fornecer informações para ajudar na seleção de acessos mais divergentes visando a introdução em programas de melhoramento. Esta caracterização pode ser feita utilizando as características agrônômicas de interesse, como TA e TG, e por meio de marcadores moleculares ou das duas formas. Atualmente o uso de marcadores moleculares é uma abordagem viável neste tipo de análise, quanto maior o número de marcadores utilizados na caracterização maior diferença pode ser observada entre os acessos. Pensando nisso, foram desenvolvidos para este trabalho marcadores moleculares SSR e SNP para complementar os marcadores disponíveis na literatura e, assim, caracterizar todos os genes envolvidos na rota da biossíntese do amido.

Com base nos marcadores SSR foi encontrada alta variabilidade genética nos acessos. Todos os marcadores desenvolvidos para este trabalho e os descritos na literatura apresentaram polimorfismo, com média de 8,75 alelos por loco e PIC igual a 0,63. Quando o mesmo conjunto de acessos foi avaliado por Borba (2007), utilizando 86 marcadores SSR, foi encontrada uma média de 12,4 alelos por loco e PIC igual a 0,75. O

que a seleção dos acessos da CNAE foi bem-sucedida para fornecer uma alta variabilidade alélica. A diferença encontrada nos valores dos dois trabalhos provavelmente está relacionada ao número de marcadores utilizados em cada. O número de alelos encontrados na CNAE está entre os valores observados em outras coleções, os menores valores foram encontrados por Cho et al. (2000) e Jain et al. (2004), com médias de 5,1 e 7,8 alelos por locus, respectivamente. Xu et al. (2004) e Thomson et al. (2007) encontraram médias de alelos iguais a 11,9 e 13 alelos por loco, respectivamente.

A diversidade genética dos acessos com sistema de cultivo irrigado foi maior que dos acessos com sistema sequeiro. Esta diferença provavelmente está relacionada à origem dos acessos, em que condera-se que acessos irrigado têm origem indica e sequeiro origem japônica (Khush, 1997). As variedades indica ocupam ambientes bastante diversificados, isso pode ter conduzido diferentes processos de adaptação e gerado maior diversidade genética. Em outros trabalhos que avaliaram variedades de arroz dos dois locais de origem, também foi encontrada maior diversidade para as variedades indica (Garris et al., 2005; Borba, 2007).

As diferenças adaptativas dos genótipos devido a diferenças no ambiente, também podem explicar a existência de alelos privados para os dois sistemas de cultivo (Guimarães et al., 2006). Este resultado é mais um indícioda diferença na composição genética das variedades dos dois tipos de origem. Dos alelos privados encontrados, pode ser destacado o alelo 168 do marcador GB1s, em que foi privado para acessos irrigados e teve alta frequência quando comparado aos outros alelos, que podem ser considerados raros por terem frequência inferior a 0,05%. Os alelos privados têm valor potencial como fonte de variabilidade genética de programas de melhoramento, podem ser utilizados para aumentar a base genética de cultivares. Também houve diferença na frequência dos alelos entre os dois sistemas de cultivo para a maior parte dos marcadores.

Quando avaliadas as frequênciasalélicaspara as classes de TA, os alelosdos marcadores W2R, RM190, RM197 e GB1s apresentaramgrandediferença em suas frequências entre as três classes. Destes marcadores, apenas o RM 197 não está localizado no gene waxy, este é um gene que está estreitamente relacionado ao TA (Yi et al., 2009). Para as classes de TG, os alelos dos marcadores F7-F22-R1-R21, RM190 e SBE1 apresentaram maior diferença nas frequências entre as três classes. Sendo que o conjunto F7-F22-R1-R21 foi desenvolvido para avaliar indivíduos com diferentes TG (Bao et al., 2006b). Estes resultados demonstramuma relação dos marcadores utilizados com as características físico-química do grão de arroz avaliadas.

juências alélicas dos acessos foi observada no dendrograma de similaridade genética e na análise fatorial de correspondência. Foi possível confirmar a diferenciação genética entre os acessos irrigado e sequeiro e entre acessos com diferentes TA. A distância genética entre os acessos foi similar a distância encontrada por Borba (2007), em dendrograma construído com 24 acessos da CNAE. Foram observados grupos nos dois dendrogramas compostos pelos mesmos acessos.

Avaliar a associação de marcadores moleculares com característica fenotípica de interesse agrônômico é uma importante estratégia para programas de melhoramento genético. Quando fortes associações são encontradas é possível utilizar ferramentas moleculares para implantar a seleção assistida. Esta prática gera grandes benefícios, por reduzir o tempo necessário para alcançar o fenótipo de interesse e ser possível selecionar os indivíduos ainda em estágios iniciais, reduzindo o tempo do ciclo da seleção. As dificuldades para implantar a seleção assistida estão relacionadas à inconsistência dos efeitos dos marcadores, mas com o mapeamento associativo é possível determinar de forma mais precisa o efeito dos marcadores nas características. Este tipo de mapeamento tem potencial para obter resolução a nível de genes (alelos) das características quantitativas (Fusari et al., 2008). O mapeamento associativo identifica não apenas o QTL, mas o polimorfismo dentro de um gene responsável pela variação fenotípica (Palaisa et al., 2003; 2004). O mapeamento associativo utilizando informações de desequilíbrio de ligação é bastante usado para testar relação de polimorfismos específicos da sequência de genes candidatos e variação fenotípica (Thornsberry et al., 2001; Flint-Garcia et al., 2003; Gupta et al., 2005). Quando se utiliza genes candidatos na análise de associação, permite-se detectar genes com pequeno ou moderado efeito no fenótipo (Ferreira & Grattapaglia, 2006).

Como as características quantitativas são controlada por vários genes, é necessário saturar com marcadores moleculares a maior parte possível do genoma. Por isso, buscou-se neste trabalho avaliar todos marcadores de todos os genes envolvidos na rota da biossíntese do amido. Estudos genéticos indicam que características físico-químicas do amido, como TA, TG, podem ser controladas por um a três genes com efeitos principais, e um ou mais genes secundários (He et al., 1999; Bao et al., 2000; Bao et al., 2004; Wan et al., 2004; Fan et al., 2005).

Para o conjunto de indivíduos avaliados foi encontrada associação para nove marcadores, em pelo menos uma das duas características avaliadas. As análises de associação foram realizadas utilizando o modelo linear misto (MLM), por permitir a combinação da informação de parentesco e da estrutura populacional, reduzindo o erro de tipo 1 (Yu et al., 2006). Alguns acessos apresentam mistura em sua ascendência, no

álise pelo fato dos resultados não terem alterados quando as análises foram testadas sem estes indivíduos, indicando que foi mantido o poder da análise de associação.

As análises foram conduzidas para quatro conjuntos de indivíduos, um englobando todos os acessos, outros dois conjuntos separaram os acessos de acordo com o sistema de cultivo. Por fim, o quarto conjunto de indivíduos foi formando pela mini coleção, que é uma análise vantajosa por ter amostragem mínima e variação máxima, quanto ao sistema de cultivo e valores de TA, gerando um efeito normalizador que minimiza a estrutura populacional e cria uma situação favorável para a análise de associação (Breseghello & Sorrels, 2006).

Os SNP foram sequenciados apenas para os indivíduos da mini coleção. As sequências demonstraram ser bastante conservadas, dos 26 marcadores SNP apenas 10 apresentaram polimorfismo. A diversidade nucleotídica foi baixa, com média igual a 0,005. O marcador CA-2 teve a maior quantidade de polimorfismo encontrados, 9 SNP em um intervalo de 300 pb (média de 1 SNP a cada 33,3 pb), valor considerado alto quando comparado com a média encontrada no genoma do arroz que é de aproximadamente um SNP a cada 268pb e um indel a cada 953pb SNP (Xu et al., 2005).

Destes marcadores SNP dois apresentaram associação com TA, CA 2 e PGE, ambos explicaram 50% da variação fenotípica. Estes marcadores estão localizados nos genes que sintetizam as enzimas *glucose fosfato isomerase*, enzima multifuncional, e *phosphoglucumutase*, que catalisa a conversão da glucose-6-fosfato em 6 fosfato de frutose, respectivamente. Para TG apenas o PGE apresentou associação, explicando 43% da variação. Avaliando as outras classes de marcadores, apenas W2R apresentou associação, foi associado ao TA e explicou 70% da variação. Este marcador está localizado no gene *waxy* e, como foi dito anteriormente, é um gene com grande influência para o TA. Isto explica a forte associação observada.

A análise de associação utilizando todos os acessos demonstrou que os marcadores RM190, W2R e F7-F22-R1-21 foram associados com TA e TG e o marcador GB1s associado com o TA. Estes marcadores também tiveram associação significativa com TA quando avaliados os acessos com sistema de cultivo irrigado, que também teve associação de TG com F7-F22-R1-21 e SBE3. O marcador SBE3 está localizado no gene *sbe3* que sintetiza enzimas responsáveis pelas ramificações na molécula de amido. Está relacionado à síntese da amilopectina (Han et al., 2004). O comprimento das ramificações determina a temperatura de gelatinização dos grânulos de amido (Aiko et al., 2001), isto pode explicar a associação do marcador SBE3 com TG.

marcadores RM 190, GB1s e W2R foram associados a TA e com TG foram associados, W2R, GB1s, F7-F22-R1-21, SS3s e SS1s, sendo que os dois ultimos marcadores foram desenvolvidos para este trabalho e cada um explicou aproximadamente 40% da variação fenotípica. O marcador SS1s juntamente com o RM197 amplificam fragmentos do gene *SS1*, que é responsável pela síntese da enzima soluble starch synthase I, que está responsável pela síntese de amilopectina. De acordo com Takemoto-Kuno et al. (2006), a atividade desta enzima é diferente entre as subespécies indica e japônica, o que pode explicar a associação do marcador SS1s apenas para os acessos sequeiro.

O marcador RM190 está localizado no gene *waxy*, que é responsável pela expressão da proteína *granule bound starch synthase I*, que tem grande influência no teor de amilose no amido (Ayres et al., 1997). Este marcador foi analisado pela primeira vez por Bligh et al. (1995), desde então tornou-se o marcador mais estudado para avaliar as características físico-químicas do amido, principalmente o TA. No presente trabalho foram encontrados um total 11 alelos para este marcador, corroborando resultados obtidos em estudo com acessos da CNAE em que foram encontrados o mesmo número de alelos (Borba, 2007). Alguns trabalhos encontraram menor número de alelo, como 8 alelos encontrado por Ayres et al., (1997), Shu et al., (1999) e Bao et al., (2002), 9 alelos encontrados por Bergman et al., (2001) e 10 alelos encontrados por Bao et al. (2006a). A diferença na quantidade de alelos identificados no RM190 pode estar relacionada com o número e a origem dos acessos avaliados. Prathepha (2003) avaliando acessos com origem da Tailândia encontrou 11 alelos. Foi encontrada associação significativa do marcador RM 190 com TA explicando em média 57 % da variação fenotípica. Apenas para a mini coleção não foi encontrado resultado significativo. Borba (2007) em análise com acessos da CNAE também encontraram resultados significativos, em que o marcador explicou 42,5% e 49% da variação. Em trabalho que foram avaliados arroz nonWaxy foi encontrada associação que explicou quase 90% da variação (Bao et al., 2006a). Esta diferença nos resultados provavelmente está relacionada ao tipo de arroz analisado. De acordo com estudos realizados anteriormente (Ayres et al., 1997; Shu et al., 1999; Bergman et al., 2001, Bao et al., 2006a), os alelos do marcador RM 190 com poucas repetições do motivo (CT) foram associados com alto TA e os alelos com maiores números de repetições do motivo foram associados com baixo TA. Esta relação do tamanho dos alelos com as classes de TA também foram observadas no presente trabalho, como comprovado pelo teste de Tukey e a correlação de Sperman. Em estudos anteriores o RM 190 foi associado com TA em análise de QTL com populações

et al., 1999; Lanceras et al., 2000; Zhou et al., 2003; Septiningsih et al., 2003; Aluko et al., 2004; Fant et al., 2005).

Resultado similar foi encontrado ao encontrado para o Rm 190 foi encontrado para o marcador GB1s, um novo marcador que foi desenvolvido para este trabalho. Também localizado no gene *waxy*, este marcador apresentou forte associação com TA, explicou em média 54 % da variação. Este marcador apresentou 10 alelos, número próximo ao encontrado no RM 190. Assim como, os outros marcadores localizados no gene *waxy*, os resultados do marcador GB1s permitem que ele seja considerado uma importante ferramenta para avaliar TA.

Para o marcador W2R, baseado em SNP (G/T) no gene *waxy*, foi observada associação com TA em todas as análises. Este marcador apresentou a associação mais forte com TA, explicou até 82 % da variação de TA. Bao et al. (2006a), observaram associação de 89% da variação e Ayres et al. (1997) associação de 85,9%. Foi observado que a base (T) está associado a baixa TA e a base (G) está associada a alta TA. Este resultado também foi observado na análise da frequência alélica e na correlação de Spearman. Segundo Ayres et al., (1997) o polimorfismo deste marcador (G/T) não é suficiente para distinguir TA alto e intermediário, ou seja, somente este marcador diferencia alto e baixo TA.

O conjunto de *primers* F7-F22-R1-R21 detecta o SNP GC/TT presente no gene *SSIla* (Chen et al., 2003). Este gene é responsável pela síntese da enzima *soluble starch synthase2.3*, que tem a função de determinar a estrutura da amilopectina. Na análise de associação este marcador apresentou associação com as duas características em pelo menos uma das análises, explicando em média 38% da variação encontrada em TA e 60% da variação de TG. Bao et al. (2006b) ao avaliar a relação deste marcador com TG observaram associação em que foi explicado 60 % da variação fenotípica. Estes resultados sugerem que este marcador pode ser utilizado para seleção assistida, o polimorfismo (CG/TT) está associado ao alto e baixo TG. No entanto, não pode explicar sozinho a diferença entre os fenótipos com TG alta e intermediária. Em estudos anteriores de QTL foi identificado que a TG pode ser controlada por gene de degradação alcalina (*alk*) (He et al., 1999; Bao et al., 2004; Fan et al., 2005) ou pelo gene *waxy* (Tan et al., 1999). Isto explica as associações observadas entre os marcadores do gene *waxy* e a variação da TG.

Os resultados deste trabalho possibilitam separar marcadores moleculares que podem auxiliar em programas de melhoramento genético, por meio de seleção assistida de marcadores.

7. CONCLUSÃO

- Foi observado que a maior parte dos acessos que compõem a CNAE possuem temperatura de gelatinização do grão entre 69 °C e 73 °C;
- Houve maior percentual de acessos da CNAE com alto teor de amilose;
- O desenvolvimento de marcadores moleculares envolvidos na rota de biossíntese do amido e a otimização de reações de amplificação foram eficientes, os marcadores apresentaram excelente padrão de qualidade;
- O conjunto de marcadores microssatélite utilizados neste trabalho possuem alto poder de discriminação de indivíduos, sendo ideais para caracterização genética;
- Os acessos da CNAE possuem alta variabilidade genética nas regiões microssatélite. Sendo que acessos com sistema de cultivo irrigado possuem variabilidade maior do que acessos com sistema de cultivo sequeiro;
- O conjunto de marcadores SSR, CAPS, STS são eficientes na discriminação de acessos de acordo com o sistema de cultivo e de acordo com o teor de amilose;
- Foi validada a associação dos marcadores descritos previamente na literatura Rm 190 e W2R com o teor de amilose e do marcador F7-F22-R1-R21 com a temperatura de gelatinização. Podem ser indicados para selecionar indivíduos para programas de melhoramento, por meio da seleção assistida;
- Foi indicada forte associação do marcador GB1s com teor de amilose, com isso, este novo marcador pode ser indicado para realizar seleção assistida;
- Os marcadores SNP, CA-2 e PGE explicaram parte da variação do teor de amilose, podem ser utilizados para complementar as informações para realizar seleção assistida;
- O marcador descrito na literatura SBE3 e os novos marcadores SS1s e SS3s foram associados com temperatura de gelatinização, podem ser indicados para complementar as informações dos indivíduos para a seleção assistida.

8. REFERÊNCIAS

- ABADIE, T.; CORDEIRO, C. M. T.; FONSECA, J. R.; ALVES, R. B. N.; BURLE, M. L.; BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; CASTRO, E. M.; SILVA, H. T.; FREIRE, M. S.; ZIMMERMANN, F. J. P.; MAGALHÃES, J. R. S. O. Constructing a rice core collection for Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 129-136, 2005.
- ABDALLAH, J. M.; GOFFINET, B.; CIERCO-AYROLLES, C.; PÉREZ-ENCISO, M. Linkage disequilibrium fine mapping of quantitative trait loci: A simulation study. **Genetics Selection. Evolution**, v. 35, n.5, p. 513-532, 2003.
- AIKO, N.; YASUNORI, N.; NAOKI, T.; HIKARU, S. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 459-472, 2001.
- AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theor. Appl. Genet.**, v.94, p. 61-67, 1997.
- ALUKO, G.; MARTINEZ, C.; TOHME, J.; CASTANO, C.; BERGMAN, C.; OARD, J. H. QTL mapping of grain quality traits from the interspecific cross *Oryza sativa* × *O. glaberrima*. **Theor. Appl. Genet.**, v.109, p. 630-639, 2004.
- ASAOKA, M.; OKUNO, K.; SUGIMOTO, Y.; KAWAKAMI, J.; FUWA, H. Effect of environmental temperature during development of rice plants on some properties of endosperm starch. **Starch**, v. 36, p. 189-193, 1984.
- ASAOKA, M.; OKUNO, K.; FUWA, H. Effect of environmental temperature at the milky stage on amylose content and fine structure of amylopectin of waxy and non-waxy endosperm starches of rice (*Oryza sativa* L.). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, p. 373-379, 1985.
- AYRES, N. M.; MCCLUNG, A.; LARKIN, P. D.; BLIGH, H. F. J.; JONES, C. A.; PARK, W. D. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. **Theor. Appl. Genet.**, v.94, n. 6/7, p. 773-781, 1997.
- BILIADERIS, C.G. Non-equilibrium phase transition of aqueous starch systems. In: Levine, H., Slade, L. (Eds.), **Water Relationships in Foods**, Plenum Press, New York, p. 251-272, 1991.
- BAO, J. S.; ZHENG, X. W.; XIA, Y. W.; HE, P.; SHU, Q. Y.; LU, X.; CHEN, Y.; ZHU, L. H. QTL mapping for the paste viscosity characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v.100, p. 280-284, 2000.
- BAO, J.; CORKE, H.; SUN, M. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 105, p. 898-905, 2002.

CORKE, H. Analysis of quantitative trait locus for some starch properties in rice (*Oryza sativa* L.), thermal properties, gel texture, swelling volume. **Journal Cereal Science**, v. 39, p. 379-385, 2004.

BAO, J. S.; CORKE, H.; SUN, M. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonWaxy rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 113, n. 7, p. 1185-1196, 2006a.

BAO, J. S.; CORKE, H.; SUN, M. Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 113, p. 1185-1196, 2006b.

BASSINELLO, P. Z.; RANGEL, P. H. N.; MOURA NETO, F. P.; KOAKUZU, S. N. Avaliação de linhagens de arroz irrigado com tipo de grãos para a culinária japonesa. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 17**: Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, 2005. 16 p.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; GOUDET, J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. GENETIX logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, **University of Montpellier II**, Montpellier, version 4.05, 2004.

BERGMAN, C. J.; DELGADO, J. T.; MCCLUNG, A. M.; FJELLSTROM, R. G. An improved method for using a microsatellite in the rice Waxy gene to determine amylose class. **Cereal Chemistry**, v. 78, p. 257-260, 2001.

Bligh, H.F.J.; TILL, R.I.; JONES, C.A. A microsatellite sequence closely linked to the waxy gene of *Oryza sativa*. **Euphytica**, v. 86, p. 83-85, 1995.

BORBA, T.C.O. **Diversidade genética e mapeamento associativo para produção e qualidade de grão dos acessos melhorados da coleção nuclear de arroz da Embrapa**, 2007. 109 f. Tese (Doutorado em genética e Melhoramento de Plantas)- Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 4ª Ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 525 p.

BRESEGHELLO, F.; SORRELS, M. E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Genetics**, v. 172, n. 172, p. 1165-1177, 2006.

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 104, p. 1192-1203, 2002.

BUCKLER, E. S.; THORNSBERRY, J. M. Plant molecular diversity and applications to genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 107-111, 2002.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, p. 9-78, 2006.

CASTRO, E.M., VIEIRA, N.R.A., RABELO, R.R; SILVA, S.A. Qualidade de grãos em arroz. **EMBRAPA**, p. 34, 1999.

CHEN, M. H.; BERGMAN, C. J.; FJELLSTROM, R. G. SSSIIa locus genetic variation associated with alkali spreading value in international rice germplasm. In: **Proceedings of the plant and animal genomes conference**, v. XI. p 314, 2003.

CHEN, M. H.; BERGMAN, C.; PINSON, S.; FJELLSTROM, R. Waxy gene haplotypes: associations with apparent amylose content and the effect by the environment in an

- on. **Journal of Cereal Science**, v. 47, p. 536-545, 2008.
- CHO, Y. G.; ISHII, T.; TEMNYKH, S.; CHEN, X.; LIPOVICH, L.; PARK, W. D.; AYRES, N.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S. R. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 100, p. 713-722, 2000.
- CLAYTON, W.D.; RENVOIZE, S.A. Genera Graminum: Grasses of the World. Kew Bulletin Additional Series 13, **Royal Botanical Garden**, London. p. 389, 1986.
- COELHO, A.H.R.; VILELA, E. R.; CHAGAS S. J. R. Qualidade de batata (*Solanum tuberosum* L.) para fritura, em função dos níveis de açúcares redutores e amido, durante o armazenamento refrigerado e à temperatura ambiente com atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.4, p.899-910, 1999.
- DAIUTO, E. R.; CEREDA, M. P.; CARVALHO, L. J. C. B. Características e propriedades do amido extraído de camadas do tecido da raiz de mandioca cv. Mico (*Manihot esculenta* Crantz). **Braz. J. Food Technol.** Preprint Serie, n.102, 2002.
- DURAN, C.; NIKKI, A.; DAVID, E.; JACQUELINE, B. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data storage and visualization. **Current Bioinformatics**, v. 11, p. 37 -41, 2009.
- EWING, B.; GREEN, P. Base Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Edinburgh: Longman Group Limited, p. 464, 1996.
- FAN, C. C.; YU, X. Q.; XING, Y. Z.; XU, C. G.; LUO, L. J.; ZHANG, Q. F. The main effects, epistatic effects and environmental interactions of QTLs on the cooking and eating quality of rice in a doubled-haploid line population. **Theor. Appl. Genet.**, v. 110, p. 1445-1452, 2005.
- FENG, C.D.; STEWART, J.M.; ZHANG, J. F. STS markers linked to the Rf1 fertility restorer gene in cotton. **Theor. Appl. Genet.**, v. 110, p. 237-243, 2005.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed). **Marcadores Moleculares**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. cap. 8, p. 276-306.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.
- FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER IV, E. S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review on Plant Biology**, v. 54, p. 357-374, 2003.
- FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. Propriedades do Amido. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Propriedades Gerais do Amido**. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, 2001.
- FRANKEL, O.H. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: ARBER, W.; LLIMENSEE, K.; PEACOCK W. J.; STARLINGER, P. (Ed). **Genetic anipulation: Impact on Man and Society**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 161-170, 1984.
- FREI, M.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Studies on in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v.83, p.395-402, 2003.
- FUSARI, C. M.; LIA, V. V.; HOPP, H. E.; HEINZ, R. A.; PANIEGO, N. B. Identification of single nucleotide polymorphisms and analysis of linkage disequilibrium in sunflower elite inbred lines using the candidate gene approach. **BMC Plant Biol.**, v. 8, p.7, 2008.

- technology and composition of starch. In: GALLIARD, T. (Ed). **Starch: Properties and Potential**. Society of Chemical Industry, Chichester. 1987. 151 p.
- GARRIS, A. J.; MCCOUCH, S. R.; KRESOVICH, S. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the *xa5* locus of rice (*Oryza sativa* L.). **Genetics**, v. 165, n. 2, p. 759-769, 2003.
- GARRIS, A. J.; TAI, T. H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v. 169, n. 3, p. 1631-1638, 2005.
- GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2008.
- GUIMARÃES, C. M.; SANTOS, A. B.; MAGALHÃES, A. M.; STONE, L. F. Sistemas de cultivo. In: Santos AB, Stone LF, Vieira NR (Ed). **A cultura do arroz no Brasil**. 2ed. Santo Antonio de Goias: Embrapa, cap. 3, p. 53-96, 2006.
- GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v. 113, p. 163-185, 2000.
- GUPTA, P. K.; ROY, J. K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v. 80, n. 4, p. 4524-535, 2001
- GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, v. 57, n. 4, p. 461-485, 2005.
- HAYASHI, K.; HASHIMOTO, N.; DAIGEN, M.; ASHIKAWA, I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. **Theor. Appl. Genet.**, v. 108, p. 1212-1220, 2004.
- HAN, Y. P.; XU, M. L.; LIU, X. Y.; YAN, C. J.; KORBAN, S. S.; CHEN, X. L.; GU, M. H. Genes coding for starch branching enzymes are major contributors to starch viscosity characteristics in *Waxy* rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 166, p. 357-364, 2004.
- HE, P.; LI, S. G.; QIAN, Q.; MA, Y. Q.; LI, J. Z.; WANG, W. M.; CHEN, Y.; ZHU, L. H. Genetic analysis of rice grain quality. **Theor. Appl. Genet.**, v. 98, p. 502-508, 1999.
- HILL, W. G.; WEIR, B. S. Maximum-likelihood estimation of gene location by linkage disequilibrium. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 54, p. 705-714, 1994.
- ILIC, K., T. Berleth and N.J. Provart. 2004. BlastDigester - a webbased program for efficient CAPS marker design. **Trends in Genetics**, v. 20, p. 280-283, 2004.
- ISHII, T. et al. Nuclear and chloroplast microsatellite variation in A-genome species of rice. **Genome**, v. 44, p. 658-666, 2001.
- JAIN, S., Jain, R. K.; MCCOUCH, S. R. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 109, p. 965-977, 2004.
- JENNINGS, D.L. Cassava. In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. London: Longman, p.81-84, 1979.
- JI, X.; XIE, C.; NI, Z.; YANG, T.; NEVO, E.; FAHIMA, T.; LIU, Z.; SUN, Q. Identification and genetic mapping of a powdery mildew resistance gene in wild emmer (*Triticum dicoccoides*) accession IW72 from Israel. **Euphytica**, 159: 385-390, 2008.
- JULIANO, B. Amilose analysis - A review. **Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality**. Los Banos, Philippines, p. 251-260, 1979.

- proteins, and lipids of rice. In: JULIANO, B.O. (Ed.). Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, cap.3, p.17-57, 1985.
- JULIANO, B. O.; GODDARD, M. S. Cause of varietal difference in insulin and glucose responses to ingested rice. **Plant Foods Human Nutrition**, v. 36, p. 36:35, 1986.
- JULIANO, B.O. **Rice in human nutrition**. Rome: FAO, 1993. Online. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em junho de 2007.
- KIKUCHI, S.; SATOH, K.; NAGATA, T.; KAWAGASHIRA, N.; DOI, K.; DISHIMOTO, N.; YAZAKI, J.; ISHIKAWA, M.; YAMADA, H.; OOKA, H.; et al. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. **Science**, v. 301, p.376-379, 2003.
- KHUSH, G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 35, n. 1/2, p. 25-34, 1997.
- KOMATSU, S.; KOJIMA, K.; SUZUKI, K.; OZAKI, K.; HIGO, K. Rice proteome database based on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: its status in 2003. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 388-392, 2004.
- KOMATSU, S.; TANAKA, N. Rice proteome analysis: A step toward functional analysis of the rice genome. **Proteomics**, v. 5: 938-949, 2005.
- KRAAKMAN, A. T. W.; MARTÍNEZ, F.; MUSSIRALIEV, B.; VANEEUWIJK, F. A.; NIKS, R. E. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. **Molecular Breeding**, v. 17, p. 41- 58, 2006.
- KWOK, P. Y.; DENG, Q.; ZAKERI, H.; NICKERSON, D. A. Increasing the information content of STS-based genome maps: Identifying polymorphisms in mapped STSs. **Genomics**, v.31, p. 123-126, 1996.
- LANCERAS, J. C.; HUANG, Z. L.; NAIVUKUL, O.; VANAICHIT, A.; RUANJAICHON, V.; RRAGOONRUNG, S. Mapping of genes for cooking and eating qualities in Thai jasmine rice (KDML105). **DNA Research**, v. 28, p. 93-101, 2000.
- LARKIN, P.D.; PARK, W.D. Transcript accumulation and utilization of alternate and non-consensus splice sites in rice granule-bound starch synthase are temperature-sensitive and controlled by a single-nucleotide polymorphism. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 719-727, 1999.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A. MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T D.G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.
- LEE, G.A.; KOH, H.J.; CHUNG, H.K.; DIXIT, A.; CHUNG, J.W.; MA, K.H.; LEE, S.Y.; LEE, J.R.; LEE, G. S.; Gwag, J.G. et al. Development of SNP-based CAPS and dCAPS markers in eight different genes involved in starch biosynthesis in rice. **Molecular Breeding**, v. 24, p. 93-101, 2009.
- LEONEL, M.; SARMENTO, S.B.S.; CEREDA, M. P.; GUERREIRO, L. M. R. Extração e caracterização do amido de biri (*Canna edulis*). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, n.1, p.27-32, 2002.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>, 2001.
- LITTLE, R.R.; HILDER, G.B.; DAWSON, E.H. Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. **Cereal Chemis.**, n.35, p.111-26, 1958.

- Wild *Oryza* species as potential sources of drought-adaptive traits. *Euphytica*, v. 100, p. 149-161, 2004.
- LU, B.R. Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae): historical perspective and current status. **Int. Rice Res. Notes**, v.24, p. 4-8, 1999.
- LU BR, ZHENG, K. L.; QIAN, H. R.; ZHUANG, J. Y. Genetic differentiation of wild relatives of rice as assessed by RFLP analysis. **Theor. Appl. Genet.**, v. 106, p. 101-106, 2002.
- LU, H; REDUS, M. A.; COBURN, J. R.; RUTGER, J. N.; MCCOUCH, S. R.; TAI, T. H. Population structure and breeding patterns of 145 U.S. rice cultivars based on SSR marker analysis. **Crop Science**, v. 45, n. 1, p. 66-76, 2005.
- MACDONALD, F. D.; PREISS, J. Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and waxy maize. **Plant Physiol.**, v. 78, p. 849-852, 1985.
- MANNERS, D.J. Starch. In: MANNERS, D.J. **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. Edinburg: Academic Press, 1985. cap. 4, p. 149-190.
- MARTINEZ, C. Y.; CUEVAS, F. Evaluación de la calidad culinaria y molinera del arroz. **Guia del estudio**. Cali: CIAT, 1989. 75 p.
- MATSUI, K.; MANO, Y.; TAKETA, S.; KAWADA, N.; KOMATSUDA, T. Molecular mapping of a fertility restoration locus (Rfm1) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor Appl Genet.**, v. 102, p. 477-482, 2001.
- MAURER, H. P.; KNAACK, C.; MELCHINGER, A. E.; OUZUNOVA, M.; FRISCH, M. Linkage disequilibrium between SSR markers in six pools of elite lines of an European breeding program for hybrid maize. **Maydica**, v. 51, p. 269-279, 2006.
- MCCOUCH, S. R.; CHEN, X.; CHO, Y. G. Sequence divergence of rice microsatellites in *Oryza* and other plant species. **Mol. Genet. Genomics**, v. 268, p. 331-343, 2002.
- MORISHIMA, H. Background information about *Oryza* species in tropical America. In: **Investigations of plant genetic resources in the American basin with emphasis on the genus *Oryza***: Report of 1992/93 Amazon Project; Monbusho Int. Sci. Res. Prog., 1994, 102 p.
- MULLER-ROBER, B.; KOBMANN, J. Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants. **Plant Cell and Environment**, v. 17, p. 601-613, 1994.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.
- NAKAJUMA, Y.; YAMAMOTO, T.; MURANAKA, T.; OEDA, K. Genetic variation of petaloid male-sterile cytoplasm of carrots revealed by sequence-tagged sites (STSs). **Theor. Appl. Genet.**, v. 99, p. 837-843, 1999.
- NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 29-56 p.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, n. 89, p. 583-590, 1978.
- NI, J.; COLOWIT, P. M.; MACKILL, D. Evaluation of genetic diversity in rice using microsatellite markers. **Crop Science**, v. 42, n. 2, p. 601-607, 2002.
- OLSON, R.K.; WISE, B.; CONNERS, F.; RACK, J.; FULKER, D. Specific deficits in component reading and language skills: Genetic and environmental influences. **Journal of Learning Disabilities**, v. 22, p. 339-348, 1989.
- PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Sete Lagoas: **Circular técnica 75**, Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

- selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. **Plant Cell**, v. 15, p.1795-1806, 2003.
- PALAISSA, K.;MORGANTE, M.;TINGEY, S.; RAFALSKI, A. Long-range patterns of diversity and linkage disequilibrium surrounding the maize *Y1* gene are indicative of an asymmetric selective sweep. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 9885-9890, 2004.
- PARKER, R.; RING, S. G. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. **Journal of Cereal Science**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 1-17, 2001.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor. Appl. Genet.**, v. 85, p. 985-993, 1993.
- PARK, E.Y.; BAIK, B. K.; LIM, S. T. Influences of temperature-cycled storage on retrogradation and in vitro digestibility of waxy maize starch gel. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 43-48, 2009.
- PINELLI, L. L. O.;MORETTI, C. L.;ALMEIDA, G. C.;SANTOS, J. Z.;ONUKE, A. C. A.; NASCIMENTO, A. B. G. Chemical and physical characterization of fresh-cut potatoes. **Food Science and Technology**, v.26, p. 127-134, 2006.
- PRATHEPHA, P., 2003.Characterization of *Waxy* microsatellite classes that are closely linked to the rice *Waxy* gene and amylase content in Thai rice germplasm. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 25, p.1-8, 2003.
- PRITCHARD, J. K.;ROSENBERG, N. A. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 65, p. 220-228, 1999.
- PRITCHARD, J. K.;DONNELLY, P. Case-control studies of association in structured or admixed populations. **Theor. Popul. Biol.**, v. 60, p. 227-237, 2001.
- PONCET, V.; HAMON, P.; MINIER, J.; CARASCO, C.; HAMON, S.; NOIROT, M. SSR cross- amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). **Genome**, v. 47, p.1071-1081, 2004.
- PONGJANTA, J.; UTAIPATTANACEEP, A.; NAIVIKUL, O.; PIYACHOMKWAN, K. Effects of preheated treatments on physicochemical properties of resistant starch type III from pullulanase hydrolysis of high amylose rice starch. **Am. J. Food Tech.**, v. 4, p. 79-89, 2009.
- RAFALSKI, A.; MORGANTE, M. Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 2, p. 103-111, 2004.
- RANGEL, P.N. **Utilização da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* como doadora de alelos para aumento da produção e da tolerância à seca do arroz (*Oryza sativa*) via análise de AB-QTLs**. 2008.124 f. Tese (Doutorado em Biologia: Biologia Molecular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- RESURRECCION, A. P.;HARA, T.;JULIANO, B.O.;YOSHIDA, S. Effect of temperature during ripening on grain quality of rice. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.23, p.109-112, 1977.
- RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, v. 273, p. 1516-1517, 1996.
- RISCH, N. Searching for genetic determinants in the new millennium. **Nature**, v. 405, n. 7, p. 847-856, 2000.
- ROTHSCHILD, M. F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. **Probe**, v. 8, p. 13-22, 1997.
- ROZAS, J.;ROZAS, R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics**, v. 15, p.174-175, 1999.

diversity of cultivated rice (*Oryza* spp): study of the polymorphism scored at 10 isozyme loci. **Japanese journal of genetics**, v. 57, n. 1, p. 25-57, 1982.

SEPTININGSIH, E. M.; PRASETIYONO, J.; LUBIS, E.; TAI, T. H.; TJUBARYAT T.; MOELJOPAWIRO, S.; MCCOUCH, S. R. Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 107, p. 1419ñ1432, 2003.

SILVA, R. N.; DUARTE, G. L.; LOPES, N. F.; MORAES, D. M.; PEREIRA, A. L. A. Composição química de sementes de trigo (*Triticum aestivum*L.) submetidas a estresse salino na germinação. **Rev. Bras. Sementes**, v. 30, n.1, p. 123-129, 2008.

SHU, Q. Y.; WU, D. X.; XIA, Y. W.; GAO, M. W.; AYRES, N. M.; LARKIN, P. D.; PARK, W. D. Microsatellites polymorphism on the *Waxy* gene locus and their relationship to amylose content in indica and japonica rice, *Oryza sativa* L. **Acta Genetica Sinica**. College.v. 26, p. 350ñ358, 1999.

SHU, X.; JIA, L.; YE, H.; LI, C.; WU, D. Slow digestion properties of rice different in resistant starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7552ñ7559, 2009.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden package, 1998. **Methods Mol. Biol.**, v. 132, p. 115ñ130, 2000.

TAKEMOTO-KUNO, Y. SUZUKI, K.; NAKAMURA, S.; SATOH, H.; OHTSUBO, K. Soluble Starch Synthase I Effects Differences in Amylopectin Structure between indica and japonica Rice Varieties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 9234ñ9240, 2006.

TAN, Y. F.; LI, J. X.; YU, S. B.; XING, Y. Z.; XU, C. G.; ZHANG, Q. The three important traits for cooking and eating quality of rice grains are controlled by a single locus in an elite rice hybrid, Shanyou 63. **Theor Appl Genet.**, v. 99, p. 642-648, 1999.

TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **BioTechnology**, v. 7, p. 257-264, 1989.

TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. **Genome Research**, New York. v. 11, p. 1441-1452, 2001.

THIEL, T.; KOTA, R.; GROSSE, I.; STEIN, N.; GRANER, A. SNP2 CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. **Nucl. Acids. Res.**, v. 32, p. 1-5, 2004.

THOMSON, M. J.; SEPTININGSIH, E.M.; SUWARDJO, F.; SANTOSO, T.J.; SILITONGA, T.S.; MCCOUCH, S.R. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. **Theor.Appl. Genet.**, v. 114, p. 559- 568, 2007.

THORNSBERRY, J. M.; GOODMAN, J.; KRESOVICH, S.; NIELSEN, D.; BUCKLER IV, E. S. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. **Nature Genetics**, v. 28, n. 3, p. 286-289, 2001.

VANDEPUTTE, G. E.; VERMEYLEN, R.; GEEROMS, J.; DELCOUR, J.A. Rice starch. I. Strutural aspects provide insight into crystallinity characteristics and gelatinisation behavior of granular starch. **Journal of Cereal Science**, v. 38, p. 43-52, 2003.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnol.**, v. 23, p. 48ñ55, 2005.

- of rice. Manila: IRRI, Genetic Resources Handbook, 2007. 207 p.
- VAUGHAN, D. A.; LU, B.; TOMOOKA, N. The evolving story of rice evolution. **Plant Science**, v. 174, p. 394-408, 2008.
- VIEIRA, N.R.; RABELO, R.R. Qualidade Tecnológica. In: Santos AB, Stone LF, Vieira NR (Ed). **A cultura do arroz no Brasil**. 2ed. Santo Antonio de Goias: Embrapa, cap. 23, p. 869-895, 2006.
- XU, Y.; BEACHELL, H.; MCCOUCH, S. R. A marker-based approach to broadening the genetic base of rice in the USA. **Crop. Sci.**, v. 44, p. 1947-1959, 2004.
- XU, M.; ZHU, L.; SHOU, H.; PING, W. *APIN1* family gene, *OsPIN1*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. **Plant Cell. Physiol.**, v. 46, p. 1674-1681, 2005.
- WAN, X. Y.; WAN, J. M.; SU, C. C.; WANG, C. M.; SHEN, W. B.; LI, J. M.; WANG, H. L.; JIANG, L.; LIU, S. J.; CHEN, L. M.; YASUI, H.; YOSHIMURA, A. QTL detection for eating quality of cooked rice in a population of chromosome segment substitution lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p. 71-79, 2004.
- WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características 37 nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.
- WARD JUNIOR, J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, v. 58, n. 301, p. 236-244, 1963.
- WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. Carbohydrate chemistry for food scientists. St. Paul: Eagan Press. **Starch**, p. 117-152, 1997.
- WURZBURG, O.B. Modified starches: properties and uses. **CRC Press**, 277 p., 1986.
- YI, M.; THAN, N. K.; VANAVICHIT, A.; CHAI-ARREE, W. T. Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. **Field Crop Res.**, v. 113, p. 178-186, 2009.
- YU, J.; BUCKLER, E. S. Genetic Association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 155-160, 2006.
- YU, J. M.; PRESSOIR, G.; BRIGGS, W. H.; BI, I. V.; YAMASAKI, M.; DOEBLEY, J. F.; MCMULLEN, M. D.; GAUT, B. S.; NIELSEN, D. M.; Holland, J. B.; Kresovich, S.; Buckler, E. S. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nat. Genet.**, v. 38, p. 203-208, 2006.
- ZHAO, H.; NETTLETON, D.; SOLLER, M.; DEKKERS, J. C. M.. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multiallelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. **Genetical Research**, v. 86, n. 1, p. 77-87, 2005.
- ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Ageing of stored rice: changes in chemical and physical attributes. **Journal of Cereal Science**, v. 35, n. 1, p. 65-78, 2002.
- ZHOU, P. H.; TAN, Y. F.; HE, Y. Q.; XU, C. G.; Zhang, Q. Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. **Theor. Appl. Genet.**, v. 106, p. 326-331, 2003.
- ZHU, M. Y.; Wang, Y. Y.; Zhu, Y. Y.; Lu, B. R. Estimating genetic diversity of rice landraces from Yunnan by SSR assay and its implication for conservation. **Acta Bot. Sin.**, v. 46, p. 1458-1467, 2004.
- ZONDERVAN, K. T.; CARDON, L. R. The complex interplay among factors that influence allelic association. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 2, p. 89-100, 2004.

APÊNDICE

A. Identificação de acessos da Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa Arroz e Feijão, com respectivos sistema de cultivo, origem e nome comum

Identificação CNAE	Identificação do banco de germoplasma	Tipo de Plantio*	Origem	Nome comum
309	CNA0000082	I	Suriname	AWINI
310	CNA0000122	I	Índia	ARC-10666
311	CNA0000586	I	Sri Lanka	BG 090-2
312	CNA0000692	I	Índia	BKN 6820-6-3-2
313	CNA0000754	I	Peru	CHANCAY
314	CNA0000798	I	Colômbia	CICA 4
315	CNA0000923	I	México	C79-272-4-1-2-3-10
316	CNA0000950	I	Índia	IET 355
317	CNA0000952	I	Paquistão	CR36-148
318	CNA0001419	I	Colômbia	COLOMBIA 1
319	CNA0001420	I	Colômbia	CARREON
320	CNA0001423	I	Colômbia	TAPURIPA-161
321	CNA0001467	I	Índia	IET 2881
322	CNA0002222	I	Lao	KH.YOUANE (V.T.A13)
323	CNA0002246	I	Lao	KH.NGANH TAMAY (SVA33)
324	CNA0002253	I	Lao	KH.KHAO BAY (VT- A25)
325	CNA0002258	I	Tailândia	KU 56-3
326	CNA0002293	I	Tailândia	KU 94-2
327	CNA0002416	I	Libéria	LAC 12
328	CNA0001472	I	-	IPSL 169
329	CNA0002480	I	Camarões	M 40
330	CNA0002482	I	Camarões	M 44
331	CNA0001476	I	IRA	MEHR
332	CNA0002672	I	Tailândia	NAHNG PAYA 132
333	CNA0002871	I	Portugal	RIZZOTO 159
334	CNA0003195	I	Egito	GZ 944-5-2-2
335	CNA0003196	I	Egito	GZ 809-4-1-2
336	CNA0003005	S	Índia	SONA
337	CNA0003241	I	Índia	PAU 41-306-2-1- PR405
338	CNA0003411	I	Colômbia	CICA 8
339	CNA0003417	I	Japão	PI 294351
340	CNA0003446	I	Filipinas	IR 34
341	CNA0003452	I	-	CHIANUNG SEM 25
342	CNA0003569	I	Índia	KAU 2110
343	CNA0003591	I	Índia	TNAU 2686-1
344	CNA0003602	I	Índia	UPR 79-23
345	CNA0003665	I	Taiwan	KAOHSIUNG SEM YU 104
346	CNA0003668	I	Filipinas	MTU 7029
347	CNA0004308	I	Filipinas	CAROLINA SP.407
348	CNA0004552	I	Colômbia	CR 1113
349	CNA0004566	I	Colômbia	METICA 1
350	CNA0004576	I	Colômbia	ZENIT
351	CNA0004579	I	Colômbia	CAMPONI

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa Arroz e
Feijão, com respectivos sistema de cultivo, origem e nome comum

Identificação CNAE	Identificação do banco de germoplasma	Tipo de Plantio*	Origem	Nome comum
352	CNA0004625	I	Colômbia	TETEP
353	CNA0004629	I	Filipinas	IR 50
354	CNA0005014	I	China	WU 10 B
355	CNA0005015	I	China	YAR AI ZHAO B
356	CNA0005016	I	China	ZHENSHAN 97 A
357	CNA0005477	I	China	KASKHAM 36/14
358	CNA0005478	I	China	SZU MAIO
359	CNA0005853	I	Rússia	WIR 5621
360	CNA0006910	I	Indonésia	MANINJAU
361	CNA0006943	I	Filipinas	IR 54 R
362	CNA0006955	I	Itália	KORAL
363	CNA0006961	I	Itália	VITRO
364	CNA0007408	I	Colômbia	WC 144
365	ELONI	I	Suriname	ELONI
366	CIWINI	I	Suriname	CIWINI
367	CNA0004479	I	Suriname	CESWONI
368	IR8	I	Filipinas	IR8
369	IR36	I	Filipinas	IR36
370	LEBONET	I	EUA	LEBONET
371	BASMANTI 370	I	Índia	BASMANTI 370
372	NOURIN MOCHI	I	Japão	NOURIN MOCHI
373	MINAMI HATA MOCHI	I	Japão	MINAMI HATA MOCHI
374	TOMOE MOCHI	I	Japão	TOMOE MOCHI
375	MOGAMI CHIKANARI	I	Japão	MOGAMI CHIKANARI
376	ORYZICA LHANOSA	I	Colômbia	ORYZICA LHANOSA
377	ORYZICA 1	I	Colômbia	ORYZICA 1
378	CICA 7	I	Colômbia	CICA 7
379	CICA 9	I	Colômbia	CICA 9
380	HUAN-SEN- GO	I	-	HUAN-SEN-GO
381	CNA0005287	S	França	IRAT 162
382	RAMTULASI	I	-	RAMTULASI
383	CNA0000482	S	EUA	BLUEBONNETE
384	CNA0001006	S	EUA	DAWN
385	CNA0002524	S	França	MOROBEREKAN
386	CNA0003287	S	França	IREM 123-2-1
387	CNA0003288	S	França	IREM 293-B
388	CNA0003289	S	França	IREM 247
389	CNA0003362	S	França	IRAT 142
390	CNA0003375	S	França	IRAT 13

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa Arroz e

Arroz, com respectivos sistema de cultivo, origem e nome comum

Identificação CNAE	Identificação do banco de germoplasma	Tipo de Plantio*	Origem	Nome comum
391	CNA0003395	S	França	IRAT 141
392	CNA0003397	S	França	IRAT 144
393	CNA0003403	S	Nigéria	TOX 490-3-108-D1-B-B
394	CNA0004193	S	França	IREM 656
395	CNA0004428	S	França	N.7384 [RPLXDANIELA]
396	CNA0004463	S	França	N7441 [CA435XTAINUNGCHUEN2]
397	CNA0004480	S	França	IRAT 124
398	CNA0004487	S	França	MAKOUTA
399	CNA0004543	S	Nigéria	TOX 1012-12-3-1
400	CNA0004617	S	Nigéria	TOX 1011-4-2
401	CNA0004640	S	Nigéria	TOX 1785-19-18
402	CNA0004697	S	Colômbia	N.2583
403	CNA0004752	S	França	IRAT 122
404	CNA0004759	S	Nigéria	TOX 514-16-101-1
405	CNA0004788	S	Nigéria	TOX 503-4-115-B-B
406	CNA0004796	S	Nigéria	TOX 516-28-10B-D2-B-B
407	CNA0005277	S	Nigéria	TOX 1858-114
408	CNA0005326	S	Nigéria	TOX 1780-8-5
409	CNA0005334	S	Nigéria	TOX 1871-29
410	CNA0005358	S	Nigéria	TOX 1858-101
411	CNA0005970	S	Nigéria	FAROX 299
412	CNA0005972	S	Nigéria	FAROX 301
413	CNA0005994	S	Nigéria	TOX 995-208-1-101
414	CNA0006034	S	Nigéria	ITA 150
415	CNA0006035	S	Nigéria	ITA 225
416	CNA0006572	S	França	IREM 195 (ECAD)
417	CNA0006574	S	França	IRAT 112 (ECAD)
418	CNA0006940	S	EUA	LEMONT
419	CNA0006941	S	EUA	NEW BONNET
420	CNA0008092	S	França/Brasil	L 141
421	CNA0008093	S	França/Brasil	L 285
422	CNA0008411	S	EUA	BLUE BELLE
423	CNA0008412	S	EUA	BLUEBONNET 50
424	CNA0008432	S	EUA	LACASSINE
425	CNA0008545	S	Colômbia	CT 11216-10-12-B-BRM-10
426	CNA0009102	S	Colômbia	CT10006-7-2-M-5-1P-3
427	CNA0009113	S	Colômbia	CT10037-9-4-M-1-1P-2-M
428	CNA0009115	S	Colômbia	CT11632-3-3-M
429	CNA0009123	S	Colômbia	CT11891-3-3-3-M
430	CNA0009124	S	Colômbia	CT13364-7-1
431	CNA0009139	S	Colômbia	CT13366-15-4
432	CNA0009154	S	Colômbia	CT13370-2-M
433	CNA0009197	S	Colômbia	CT13377-8-4
434	CNA0009199	S	Colômbia	CT13381-1-3
435	CNA0009223	S	Colômbia	CT13569-5-7

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa Arroz e Feijão, com respectivos sistemas de cultivo, origem e nome comum				
Identificação CNAE	Identificação do banco de germoplasma	Tipo de Plantio*	Origem	Nome comum
436	CNA0009227	S	Colômbia	CT13570-3-2
437	CNA0009240	S	Colômbia	CT13572-6-2
438	CNA0009280	S	Colômbia	CT13573-11-2
439	CNA0009319	S	Colômbia	CT13579-3-4
440	CNA0009364	S	Colômbia	CT13581-5-2
441	CNA0009415	S	Colômbia	CT13582-11-4
442	CNA0009561	S	Colômbia	CT13584-12-9
443	CNA0009591	S	Colômbia	CT13585-12-3
444	CNA0005461	S	Índia	CO 18
445	CNA0010476	S	Filipinas	B8503E-TB-19- B-3
446	CNA0010527	S	-	BR4742-B-19- 23
447	CNA0005462	S	Índia	MTU 15
448	CNA0010533	S	Filipinas	1R65907-188- 1-B
449	CNA0003372	S	França	IRAT 10
450	CNA0010514	S	Filipinas	KATAKTARA
451	CNA0005465	S	Índia	W 1253
452	CNA0010469	S	Filipinas	TB47H-MR-11- 51-3
453	CNA0010503	S	Filipinas	YN1905-UUL- 62
454	CNA0010506	S	Filipinas	YN1906-UUL 65
455	CNA0010445	S	China	YUNLU N 1
456	CNA0010451	S	China	YUNLU N 7
457	RS16PL12-35- 1-B	I	EMBRAPA- CNPAF	RS16PL12-35- 1-B
458	RS16PL1-34-4- B	I	EMBRAPA- CNPAF	RS16PL1-34-4- B
459	RS16PL5-12-6- B	I	EMBRAPA- CNPAF	RS16PL5-12-6- B
460	RS16PL12-10- 1-B	I	EMBRAPA- CNPAF	RS16PL12-10- 1-B
461	IPSL 574	I	IPEACO	IPSL 574
462	CNA0001117	I	EEPG	EEPG-1-169
463	BRS AGRISUL	I	EMBRAPA- CPACT	BRS AGRISUL
464	BRS BOJURU	I	EMBRAPA- CPACT	BRS BOJURU
465	DIAMANTE	I	EMBRAPA- CNPAF	DIAMANTE
466	BRS FORMOSO	I	EMBRAPA- CNPAF	BRS FORMOSO

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa Arroz e Feijão, com respectivos sistemas de cultivo, origem e nome comum				
Identificação CNAE	Identificação do banco de germoplasma	Tipo de Plantio*	Origem	Nome comum
467	MARAJÓ	I	EMBRAPA- CNPAF	MARAJÓ
468	BRS JABURU	I	EMBRAPA- CNPAF	BRS JUBURU
469	BRS BIGUA	I	EMBRAPA- CNPAF	BRS BIGUA
470	RIO GRANDE	I	EMBRAPA- CNPAF	RIO GRANDE
471	EPAGRI 107	I	EPAGRI	EPAGRI 107
472	EPAGRI 108	I	EPAGRI	EPAGRI 108
473	SCS BRS 111	I	EPAGRI	SCS BRS 111
474	SCS BRS 112	I	EPAGRI	SCS BRS 112
475	CNA0001337	I	IPEACO	IPEACO-SL 1969
476	CNA0001339	I	IPEACO	IPEACO-SL 769
477	CNA0001344	I	IPEACO	IPEACO-SL 1469
478	CNA0001407	I	IPEACO	IPSL 2070
479	CNA0001413	I	IPEACO	IPSL 970
480	CNA0001414	I	IPEACO	IPSL 570
481	CNA0001106	I	IRGA	EEA 405
482	CNA0001107	I	IRGA	EEA 401
483	CNA0001108	I	IRGA	EEA 404
484	CNA0001109	I	IRGA	EEA 406
485	BR IRGA 409	I	IRGA	BR IRGA 409
486	BR IRGA 413	I	IRGA	BR IRGA 413
487	IRGA 416	I	IRGA	IRGA 416
488	IRGA 417	I	IRGA	IRGA 417
489	IRGA 418	I	IRGA	IRGA 418
490	IRGA 419	I	IRGA	IRGA 419
491	IRGA 420	I	IRGA	IRGA 420
492	CNA0006129	I	EMPASC	EMPASC 103
493	CNA0006130	I	EMPASC	EMPASC 104
494	CNA0001118	S	EEPG	EEPG-1-269- FURNAS
495	CNA0000963	S	IPEACO	AMARELÃO X GUEDES
496	CNA0000969	S	IPEACO	HONDURAS X MATAO
497	CNA0000976	S	IPEACO	SATURNO X PRATAO PRECOCE

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa Arroz e Feijão, com respectivos sistemas de cultivo, origem e nome comum				
Identificação CNAE	Identificação do banco de germoplasma	Tipo de Plantio*	Origem	Nome comum
498	CNA0000994	S	IPEACO	ESAV X MATAO
499	CNA0001347	S	IPEACO	IPEACO-SL 2270
500	CNA0001350	S	IPEACO	IPEACO-SL 1970
501	CNA0004098	S	EMBRAPA- CNPAF	CNA 511-12-B- 5
502	CNA0004120	S	EMBRAPA- CNPAF	CNA 092- BM10-BM27p-3
503	CNA0004121	S	EMBRAPA- CNPAF	CNA 095- BM30-BM9-28
504	CNA0004141	S	EMBRAPA- CNPAF	CNA 511-12-B- 2
505	CNA0004172	S	EMBRAPA- CNPAF	CNA 511-12-B- 4
506	CNA0004206	S	EMBRAPA- CNPAF	CNA 108-B-28- 13-1
507	CNA0004748	S	EMBRAPA- CNPAF	CNA 104-B-2- 43-2
508	CNA0005180	S	EMBRAPA- CNPAF	CNA 539-23-B- 4
509	CNA0006187	S	EMBRAPA- CNPAF	CNAX 782-28- 2-1,660018
510	CNA0006701	S	EMBRAPA- CNPAF	CNAX 1762-A- 41-2-1
511	CNA0007024	S	EMBRAPA- CNPAF	CNAX 1503-12- 9-4-B
512	CNA0007119	S	EMBRAPA- CNPAF	CNARR 2888-B- 47
513	CNA0007706	S	EMBRAPA- CNPAF	CNARR 2888-B- 12-1-1
514	CNA0008070	S	EMBRAPA- CNPAF	CNAX 3608-6-1- 2-1
515	CNA0008711	S	EMBRAPA- CNPAF	CNAX 4914-36- M-M-3
516	CNA0005673	S	EMBRAPA- CNPAF	IAC 81-176
517	CNA0005901	S	EMBRAPA- CNPAF	IAC 84-198
518	CNA0006170	S	EMBRAPA- CNPAF	LS 85-125
519	CNA0006174	S	EMBRAPA- CNPAF	LS 85-158
520	CNA0007799	S	EMBRAPA- CNPAF	IAC 1191
521	CNA0006406	S	IAC	LS 86-68

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

**Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa Arroz e
Feijão, com respectivos sistemas de cultivo, origem e nome comum**

Identificação CNAE	Identificação do banco de germoplasma	Tipo de Plantio*	Origem	Nome comum
522	CNA0004168	S	EMBRAPA- CNPAF	L 80-68
523	CNA0005672	S	EMBRAPA- CNPAF	L 82-192
524	CNA0006666	S	EMBRAPA- CNPAF	A12-286-1-1
525	CNA0006672	S	EMBRAPA- CNPAF	A8-204-1-1
526	CNA0008309	S	EMBRAPA- CNPAF	L 92-342
527	CNA0006413	S	IAPAR	L 85-20
528	CNA0006422	S	IAPAR	IAPAR L 99-98
529	CNA0005650	S	IPEACO	IPEACO 11P
530	CNA0005660	S	IPEACO	IPEACO 77P
531	CNA0003281	S	CNPAF	IRAT 177
532	CNA0005342	S	IRAT	RIO VERDE
533	CNA0002123	S	EEPG	JAPONES X PRAIANA
534	IAC 201	S	IAC	IAC 201
535	IAC 202	S	IAC	IAC 202
536	IAC 165	S	IAC	IAC 165
537	IAPAR 9	S	IAC	IAPAR 9
538	IAPAR 62	S	IAPAR	IAPAR 62
539	IAPAR 63	S	IAPAR	IAPAR 63
540	CNA0003490	S	-	MEARIN
541	CNA0004078	S	-	-
542	CNA0004243	S	-	-
543	CNA0005975	S	-	-
544	CNA0006030	S	-	-
545	CNA0007425	S	-	CANASTRA
546	CNA0007937	S	-	PROGRESSO
547	CNA0008172	S	-	BONANCA
548	CNA0008305	S	-	CARISMA
549	CNA0008533	S	-	MARAVILHA
550	CNA0008540	S	-	TALENTO

*Tipo de cultivo: I-Irrigado; S-sequeiro

marcadores microssatélite para acessos da CNAE nos
sistemas de cultivo irrigado e sequeiro

Marcador	Alelo	Frequência alélica		Frequência alélica (TA)			Frequência alélica (TG)		
		Irrigado	Sequeiro	Baixo	Int.	Alto	Baixo	Int.	Alto
Rm190	102	0,037	0,000	0,000	0,014	0,040	0,000	0,027	0,000
	106	0,073	0,015	0,000	0,000	0,107	0,025	0,047	0,038
	108	0,284	0,045	0,049	0,096	0,320	0,175	0,128	0,208
	111	0,138	0,053	0,122	0,068	0,093	0,175	0,068	0,094
	114	0,000	0,015	0,000	0,000	0,027	0,025	0,007	0,000
	118	0,064	0,076	0,146	0,096	0,040	0,025	0,068	0,113
	120	0,128	0,121	0,293	0,110	0,053	0,125	0,122	0,132
	122	0,018	0,045	0,049	0,014	0,040	0,025	0,041	0,019
	124	0,018	0,061	0,122	0,014	0,000	0,000	0,034	0,094
	126	0,128	0,098	0,073	0,110	0,120	0,050	0,128	0,113
	128	0,110	0,470	0,146	0,479	0,160	0,375	0,331	0,189
Rm197	198	0,029	0,054	0,050	0,083	0,014	0,000	0,049	0,058
	202	0,495	0,854	0,650	0,778	0,575	0,700	0,727	0,596
	204	0,200	0,038	0,075	0,056	0,192	0,225	0,091	0,077
	206	0,010	0,008	0,025	0,000	0,014	0,000	0,007	0,019
	218	0,267	0,046	0,200	0,083	0,205	0,075	0,126	0,250
OSR21	216	0,038	0,008	0,108	0,014	0,000	0,000	0,014	0,061
	220	0,019	0,048	0,054	0,014	0,014	0,000	0,028	0,082
	226	0,143	0,081	0,135	0,157	0,056	0,077	0,106	0,143
	230	0,086	0,153	0,081	0,143	0,139	0,103	0,149	0,061
	232	0,714	0,702	0,622	0,671	0,778	0,821	0,702	0,633
	248	0,000	0,008	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,020
SS3s	152	0,027	0,099	0,050	0,068	0,053	0,049	0,068	0,077
	154	0,182	0,023	0,125	0,081	0,147	0,122	0,088	0,096
	158	0,545	0,702	0,575	0,689	0,600	0,561	0,655	0,615
	162	0,245	0,176	0,250	0,162	0,200	0,268	0,189	0,212
SS1s	156	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000
	164	0,295	0,881	0,553	0,712	0,533	0,553	0,690	0,451
	166	0,343	0,040	0,158	0,136	0,213	0,289	0,141	0,196
	168	0,029	0,000	0,000	0,015	0,027	0,000	0,021	0,000
	172	0,000	0,008	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020
	176	0,010	0,008	0,000	0,015	0,013	0,000	0,014	0,000
	181	0,286	0,063	0,237	0,121	0,187	0,158	0,120	0,294
	248	0,029	0,000	0,026	0,000	0,027	0,000	0,007	0,039
GB1s	152	0,036	0,015	0,000	0,027	0,040	0,000	0,034	0,019
	156	0,264	0,069	0,175	0,081	0,240	0,244	0,129	0,173
	158	0,218	0,046	0,025	0,068	0,280	0,122	0,116	0,154
	162	0,000	0,015	0,000	0,000	0,027	0,024	0,000	0,019
	164	0,009	0,031	0,025	0,027	0,027	0,024	0,014	0,038
	166	0,036	0,062	0,100	0,041	0,040	0,049	0,054	0,038
	168	0,118	0,000	0,175	0,041	0,000	0,000	0,048	0,115
	170	0,100	0,123	0,200	0,108	0,093	0,049	0,136	0,096
	172	0,018	0,131	0,075	0,081	0,067	0,098	0,075	0,077
	176	0,200	0,508	0,225	0,527	0,187	0,390	0,395	0,269
GL3s	132	0,320	0,322	0,324	0,353	0,268	0,351	0,296	0,367
	134	0,029	0,051	0,000	0,029	0,070	0,027	0,052	0,020

	0,000	0,029	0,000	0,027	0,015	0,020
--	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Marcador	Alelo	Frequência alélica		Frequência alélica (TA)			Frequência alélica (TG)		
		Irrigado	Sequeiro	Baixo	Int.	Alto	Baixo	Int.	Alto
GL3s	144	0,000	0,042	0,027	0,029	0,028	0,000	0,037	0,000
	148	0,010	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,020
	150	0,097	0,025	0,054	0,074	0,070	0,027	0,052	0,102
	154	0,117	0,042	0,054	0,059	0,099	0,135	0,059	0,082
	160	0,058	0,110	0,108	0,059	0,113	0,081	0,081	0,102
	164	0,252	0,288	0,351	0,279	0,225	0,189	0,326	0,184
	176	0,029	0,034	0,000	0,059	0,014	0,000	0,044	0,020
	184	0,049	0,017	0,027	0,000	0,056	0,081	0,015	0,041
	200	0,019	0,042	0,054	0,029	0,028	0,054	0,022	0,041
	230	0,000	0,008	0,000	0,000	0,014	0,027	0,000	0,000
GL1s	260	0,029	0,000	0,000	0,000	0,020	0,036	0,000	0,032
	270	0,015	0,011	0,000	0,000	0,020	0,000	0,020	0,000
	280	0,074	0,033	0,111	0,039	0,040	0,036	0,050	0,065
	290	0,044	0,011	0,000	0,039	0,040	0,036	0,030	0,000
	300	0,044	0,076	0,074	0,059	0,080	0,107	0,050	0,065
	310	0,044	0,054	0,000	0,078	0,060	0,036	0,059	0,032
	320	0,191	0,446	0,222	0,431	0,280	0,321	0,376	0,226
	330	0,147	0,152	0,333	0,098	0,100	0,107	0,129	0,258
	340	0,088	0,163	0,111	0,078	0,160	0,179	0,119	0,129
	350	0,088	0,011	0,037	0,000	0,080	0,036	0,020	0,129
	360	0,206	0,033	0,074	0,157	0,120	0,107	0,119	0,065
	370	0,029	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,020	0,000
	380	0,000	0,011	0,037	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000

- B. Frequências alélicas de marcadores microssatélite para acessos da CNAE nos sistemas de cultivo irrigado e sequeiro
Int.-Intermediária

de acessos da CNAE para análise realizada com

Períodos	Acessos/Agrupamento		Nº de acessos	Coefficiente de Aglomeração
241	329	330	2	0.0000
240	386	387	2	0.0000
239	430	434	2	0.0000
238	437	475	2	0.0000
237	438	477	2	0.0000
236	504	509	2	0.0000
235	503	511	2	0.0000
234	CL238	515	3	0.0000
233	CL235	518	3	0.0000
232	481	520	2	0.0000
231	516	524	2	0.0000
230	517	530	2	0.0000
229	535	536	2	0.0001
228	415	461	2	0.0001
227	429	499	2	0.0001
226	CL234	510	4	0.0002
225	463	485	2	0.0002
224	428	522	2	0.0002
223	405	436	2	0.0002
222	CL230	529	3	0.0003
221	328	331	2	0.0003
220	CL240	388	3	0.0003
219	441	480	2	0.0003
218	CL227	CL231	4	0.0003
217	CL228	479	3	0.0003
216	CL232	519	3	0.0003
215	496	CL233	4	0.0004
214	341	349	2	0.0004
213	421	423	2	0.0004
212	440	478	2	0.0004
211	366	399	2	0.0004
210	CL236	CL229	4	0.0004
209	435	CL237	3	0.0004
208	426	427	2	0.0004
207	501	505	2	0.0004
206	458	472	2	0.0004
205	400	495	2	0.0005
204	336	344	2	0.0005
203	CL223	CL226	6	0.0005
202	CL216	539	4	0.0005
201	390	401	2	0.0005
200	425	547	2	0.0005
199	CL220	394	4	0.0006
198	433	476	2	0.0006
197	CL221	CL203	8	0.0006
196	523	527	2	0.0007
195	CL198	452	3	0.0007
194	497	500	2	0.0007
193	389	464	2	0.0007

de acessos da CNAE para análise realizada com

Períodos	Acessos/Agrupamento		Nº de acessos	Coefficiente de Aglomeração
192	CL210	CL222	7	0.0007
191	512	513	2	0.0008
190	CL207	502	3	0.0008
189	335	540	2	0.0008
188	546	549	2	0.0008
187	CL206	460	3	0.0008
186	451	508	2	0.0008
185	489	491	2	0.0008
184	CL214	348	3	0.0009
183	414	416	2	0.0009
182	525	550	2	0.0009
181	CL218	526	5	0.0009
180	CL200	431	3	0.0009
179	411	506	2	0.0010
178	457	468	2	0.0010
177	316	338	2	0.0010
176	CL189	488	3	0.0010
175	317	CL184	4	0.0010
174	CL239	432	3	0.0010
173	439	CL194	3	0.0011
172	CL197	382	9	0.0011
171	445	493	2	0.0011
170	355	444	2	0.0011
169	315	340	2	0.0011
168	CL205	CL195	5	0.0011
167	391	392	2	0.0011
166	356	467	2	0.0012
165	CL217	422	4	0.0012
164	314	CL241	3	0.0012
163	343	376	2	0.0012
162	CL224	CL192	9	0.0012
161	409	498	2	0.0012
160	347	470	2	0.0013
159	342	CL163	3	0.0013
158	417	533	2	0.0013
157	CL225	482	3	0.0013
156	CL165	CL213	6	0.0013
155	351	CL168	6	0.0014
154	CL181	CL219	7	0.0014
153	346	358	2	0.0014
152	466	490	2	0.0014
151	453	454	2	0.0015
150	473	474	2	0.0015
149	471	537	2	0.0015
148	442	456	2	0.0015
147	CL175	378	5	0.0016
146	412	521	2	0.0016
145	334	363	2	0.0016
144	311	459	2	0.0016

de acessos da CNAE para análise realizada com

Períodos	Acessos/Agrupamento		Nº de acessos	Coefficiente de Aglomeração
143	360	CL148	3	0.0016
142	406	447	2	0.0016
141	372	373	2	0.0016
140	CL170	361	3	0.0016
139	364	538	2	0.0017
138	CL182	548	3	0.0017
137	374	375	2	0.0017
136	410	CL212	3	0.0017
135	CL191	514	3	0.0017
134	CL178	CL187	5	0.0018
133	CL172	CL209	12	0.0018
132	CL179	494	3	0.0018
131	CL140	CL186	5	0.0018
130	CL211	CL162	11	0.0018
129	413	CL174	4	0.0019
128	309	CL166	3	0.0020
127	313	322	2	0.0020
126	CL159	368	4	0.0020
125	323	339	2	0.0020
124	420	CL188	3	0.0020
123	486	492	2	0.0020
122	CL176	CL157	6	0.0020
121	CL146	462	3	0.0020
120	CL133	CL154	19	0.0021
119	345	CL152	3	0.0021
118	531	541	2	0.0021
117	407	CL161	3	0.0021
116	CL164	381	4	0.0021
115	CL171	487	3	0.0021
114	319	469	2	0.0021
113	CL142	443	3	0.0021
112	365	367	2	0.0021
111	CL114	507	3	0.0022
110	CL177	369	3	0.0022
109	327	385	2	0.0022
108	CL130	CL215	15	0.0023
107	CL120	CL160	21	0.0023
106	310	379	2	0.0023
105	350	CL136	4	0.0024
104	371	532	2	0.0024
103	CL144	312	3	0.0024
102	CL196	528	3	0.0024
101	CL193	CL201	4	0.0025
100	CL122	CL149	8	0.0025
99	CL129	465	5	0.0026
98	408	448	2	0.0026
97	CL107	CL180	24	0.0027
96	CL153	352	3	0.0027
95	484	CL185	3	0.0027

de acessos da CNAE para análise realizada com

Períodos	Acessos/Agrupamento		Nº de acessos	Coeficiente de Aglomeração
94	337	CL121	4	0.0027
93	CL116	318	5	0.0027
92	332	403	2	0.0027
91	CL113	446	4	0.0027
90	333	CL117	4	0.0027
89	CL118	543	3	0.0029
88	398	CL158	3	0.0029
87	CL128	CL183	5	0.0029
86	CL124	CL208	5	0.0029
85	383	CL156	7	0.0029
84	CL167	396	3	0.0030
83	CL110	CL147	8	0.0030
82	CL105	CL199	8	0.0030
81	359	CL137	3	0.0030
80	CL169	321	3	0.0031
79	CL108	CL202	19	0.0033
78	CL104	449	3	0.0033
77	CL138	545	4	0.0033
76	324	325	2	0.0034
75	CL95	CL123	5	0.0034
74	CL204	CL75	7	0.0036
73	CL103	CL134	8	0.0036
72	377	397	2	0.0036
71	CL94	CL132	7	0.0037
70	CL106	320	3	0.0037
69	CL99	483	6	0.0038
68	CL173	455	4	0.0040
67	CL190	CL89	6	0.0040
66	CL101	CL84	7	0.0041
65	CL79	424	20	0.0041
64	CL96	353	4	0.0041
63	CL83	CL126	12	0.0042
62	CL97	CL155	30	0.0044
61	CL141	CL98	4	0.0044
60	CL93	CL125	7	0.0044
59	CL102	CL77	7	0.0045
58	CL131	404	6	0.0045
57	418	419	2	0.0046
56	CL145	362	3	0.0047
55	CL80	CL119	6	0.0051
54	CL56	CL139	5	0.0052
53	326	CL78	4	0.0053
52	CL127	CL63	14	0.0055
51	357	CL68	5	0.0055
50	CL90	CL88	7	0.0056
49	CL65	CL135	23	0.0058
48	384	CL57	3	0.0061
47	CL92	402	3	0.0062
46	CL86	CL67	11	0.0065

de acessos da CNAE para análise realizada com

Períodos	Acessos/Agrupamento		Nº de acessos	Coeficiente de Aglomeração
45	CL76	CL66	9	0.0066
44	CL81	CL61	7	0.0069
43	CL55	CL74	13	0.0070
42	CL45	CL71	16	0.0071
41	CL62	CL49	53	0.0071
40	CL53	CL91	8	0.0072
39	CL50	CL85	14	0.0074
38	CL60	CL115	10	0.0074
37	CL41	CL39	67	0.0082
36	CL54	354	6	0.0086
35	CL52	CL43	27	0.0089
34	CL46	CL59	18	0.0094
33	CL111	CL100	11	0.0098
32	CL47	393	4	0.0103
31	CL37	CL82	75	0.0105
30	CL44	CL34	25	0.0110
29	CL73	CL33	19	0.0110
28	CL38	CL42	26	0.0111
27	CL32	395	5	0.0117
26	380	450	2	0.0124
25	CL29	CL150	21	0.0129
24	CL31	534	76	0.0129
23	CL35	CL58	33	0.0130
22	CL28	CL30	51	0.0133
21	CL24	CL143	79	0.0133
20	CL25	542	22	0.0135
19	CL22	CL40	59	0.0136
18	CL69	544	7	0.0138
17	CL109	CL112	4	0.0141
16	CL87	CL23	38	0.0141
15	CL70	CL151	5	0.0142
14	CL21	CL51	84	0.0146
13	CL64	CL72	6	0.0148
12	CL15	CL17	9	0.0160
11	CL27	370	6	0.0162
10	CL19	CL18	66	0.0172
9	CL16	CL12	47	0.0178
8	CL11	CL36	12	0.0182
7	CL9	CL20	69	0.0182
6	CL7	CL13	75	0.0202
5	CL10	CL8	78	0.0231
4	CL6	CL26	77	0.0236
3	CL14	CL48	87	0.0263
2	CL5	CL3	165	0.0316
1	CL4	CL2	242	0.0468

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

e locos SSR, CAPS, STS e F7-F22-R1-R21, em acessos da CNAE

to upgrade to													
Pages and Expanded Features				BE1	F7F22R1R21	RM190	RM197	OSR21	SS3s	SS1s	GB1s	GL3s	GL1s
W2R	1	100,000	0,55152	0,86591	0,16742	0,27652	0,04697	0,87348	0,70000	0,94394	0,68788	0,63258	
SBE3	-	1	0,10303	0,74773	0,00682	0,55379	0,79015	0,70985	0,06742	0,00076	0,33561	0,00833	
SBE1	-	-	1	0,05076	0,21061	0,99470	0,04773	0,79621	0,81515	0,46667	0,16061	0,27879	
F7F22R1R21	-	-	-	1	0,03409	0,46061	0,02576	0,10455	0,13636	0,01439	0,83030	0,02121	
RM190	-	-	-	-	1	0,00076	0,00076	0,14318	0,00076	0,00076	0,00379	0,00076	
RM197	-	-	-	-	-	1	0,21061	0,10379	0,00076	0,00076	0,16970	0,00076	
OSR21	-	-	-	-	-	-	1	0,92045	0,19242	0,02121	0,02803	0,54470	
SS3s	-	-	-	-	-	-	-	1	0,03864	0,55833	0,08561	0,03561	
SS1s	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,00076	0,00682	0,00076	
GB1s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,00152	0,01439	
GL3s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,09924	
GL1s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	

*p 00,00075

ANEXOS

1. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA DE GELATINIZAÇÃO SEGUNDO MARTÍNEZ RACINES et al., (1989)

Preparo das amostras:

- Separar 10 grãos de arroz inteiros e polidos, de cada amostra;
- Colocar os grãos em caixa plástica de 4,8 x 4,8 cm;

Reagentes utilizados:

- Solução de hidróxido de potássio 1,7%

Preparo:

- Para avaliar a temperatura de gelatinização é separado os 10 grãos em caixa de acrílico 4,5x4,5, em seguida é adicionado 10 mL de então as amostras são colocadas em estufa a 30°C por 23 horas, quando finalizada esta etapa é realizado a leitura seguindo o seguinte padrão:

Grau 1- grão de arroz antes de ser submerso no hidroxido de potássio.

Grau 2- grão inchado sem perder o formato.

Grau 3- grão inchado com ligeiras aberturas, com dispersão ao redor do grão.

Grau 4-grão um pouco aberto, conservando um dos lados da mesma forma, com dispersão ao redor e macio quando tocado.

Grau 5- grão totalmente aberto, formando uma massa com manchas dispersas.

Grau 6-grão com grande nível de dispersão, perdendo a forma original.

Grau 7- grão totalmente desintegrado, observando somente o embrião.

Classificação dos graus:

Graus 2 e 3: TG alta- com temperatura entre 74 e 80°C

Graus 4 e 5: TG intermediária- com temperatura entre 69 e 73°C

Graus 6 e 7: TG Baixa- com temperatura entre 63 e 68°C

Calculo para encontrar o valor médio da amostra

Para obter o valor médio para cada amostra, é multiplicado o número de grãos enquadrados em cada classe pelo número do grau correspondente, somado todos os valores e dividido por 10, que é o número total de grãos de cada amostra.

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE ACORDO COM

BRONDANI et al., (2002)

Cortar aproximadamente 150 mg de tecido foliar, transferir para microtubo de 2 ml, sobre este material vegetal posicionar uma esfera de porcelana e adicionar 700 microlitros (700 µL) de tampão de extração CTAB 2% (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*), o qual possui detergente e um agente tamponante (2% CTAB; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 1% de Polyvinylpyrrolidone). Posicionar os microtubos em um extrator automático de DNA FASTPREP FP120 (Thermo Electron Corporation) e realizar a maceração em dois ciclos de 30 segundos com velocidade 4. Incubar o material já macerado por 45 minutos à 65 graus °C, e agitar os microtubos a cada 15 minutos. Em seguida, adicionar 600 µL de solução contendo clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1. Após várias inversões dos tubos, a fim de obter uma solução totalmente homogênea, estes centrifugar por 15 minutos à 13.000 rotações por minuto (rpm). Retirar cuidadosamente a fase aquosa, equivalente ao sobrenadante, e transferir para um novo microtubo de 1,5mL previamente identificado. Adicionar 800 µL de etanol absoluto gelado, seguido por inversão dos microtubos e armazenar no freezer à -20 °C por 2 horas a fim de precipitar o DNA e o RNA. Posteriormente, centrifugar a solução por 15 minutos a 13.000 rpm, e descartar o sobrenadante, cuidando para não descartar o precipitado. Lavar o precipitado com 800 µL de etanol 70%, seguido por uma centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm, com descarte do sobrenadante e nova lavagem utilizando 800 µL de etanol absoluto, seguida pelo descarte do sobrenadante. Manter os microtubos abertos à temperatura ambiente, para total evaporação do etanol. Após o *pellet* estar seco, ressuspender em um tampão Tris-EDTA (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0), contendo 10 µg/ml da enzima RNase para degradar o RNA, e incubar por uma hora à 37°C.

Para o preparo de gel de agarose foi utilizado o seguinte protocolo: gel de agarose 1%, 700 mL de TBE 1X (0,09M Tris Borato e 2mM EDTA), 7 gramas de agarose, 0,2 µg/ml de brometo de etídio. Após a mistura ser dissolvida com o auxílio de um microondas, o gel é montado em uma cuba de acrílico que será submetida à eletroforese (Bioagency) por 1h e 30 minutos e então registrado sob luz ultravioleta (UV) pelo sistema de fotodocumentação Bio Rad Gel Doc 2000 (Bio Rad).

4. PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA SEGUNDO CRESTE et al., (2001)

Para o preparo das placas de vidro foi utilizado: placa de Bind, solução com 1,99 mL de etanol, 10 µl de ácido acético e 6 µl de bind silane, após ser aplicado na placa é aguardado 5 minutos para secar e então a placa é limpa por duas vezes com álcool. Para a placa de repel foi utilizado 1 mL de repelente Rain X, deixar secar por 5 minutos e então lavar por duas vezes. Em seguida as placas são montadas e aplicado solução de poliacrilamida contendo 100mL de poliacrilamida 6% e 666 µl de APS (10%). Após a polimerização o gel fica pré-correndo por 45 minutos com corrente de 90W em cuba de eletroforese vertical (BioRad), e depois de aplicado as amostras a corrida continua por aproximadamente 60 minutos (depende do tamanho do fragmento). Quando encerrado o tempo de corrida a etapa seguinte é a coloração do gel onde este é passado por diferentes soluções: a primeira é a solução de fixação (1780 ml de H₂O, 200ml de etanol e 20 ml de ácido acético) onde o gel fica por 10 minutos sendo agitado constantemente, em seguida é lavado em água destilada, a Segunda solução é a oxidação (1970 ml de água destilada e 30 ml de ác. nítrico) por 3 minutos, passa pela Segunda lavagem e é levado para solução de prata (2L de água e 2g de nitrato de prata) por onde fica por 30 minutos em seguida passa por duas lavagens consecutivas e é colocado na solução de revelação (2L de água 60g de arbonato de sódio e 1,08 ml de formaldeído 30% que é colocado quando vai usar a solução) com temperatura de aproximadamente 10-12°C, onde é agitada até que haja a revelação gel, em seguida o gel é colocado na solução de stop (1900ml de água e 100ml de ác. acético) por 5 minutos, esta solução é utilizada para que o processo de revelação seja parado, em seguida o gel pela lavagem com água para finalizar o procedimento.