

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

CARACTERIZAÇÃO DA MUTAGÊNESE POR INSERÇÃO DO
RETROTRANSPOSON *TOS17* EM GENÓTIPOS DE ARROZ

Flavia Vanina Ferreira
Licenciada em Genética/UNaM

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS) Brasil
Março de 2006

DEDICO

*Aos meu pais, irmãos
e sobrinos*

*A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original...*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo.

Ao Professor Marcelo Gravina de Moraes, pela liberdade e confiança que sempre me ofereceu. Pela presença constante e amizade conquistada.

A mis padres Tim y Aníbal, por acreditar que la educación sería la mejor herencia para sus hijos.

A mis hermanos Carlos, Nuni e Caro, a mis cunhadinhos Martín Luero y Sonia Schiro, por fin a los amores de mi vida mis sobrinos: Nicolas, Camila, Dolores, Santiago, Joaquín y Agustín por el apoyo incondicional y cariño.

Ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) pelo fornecimento do material vegetal.

A Faurgs pela bolsa concedida.

Ao meus amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular Adriana, Alex, Caren, Catiane, Mônica, Marcos, Jeferson, Johannes, Oneides, Paulinha, Paulo, Ricardo, Sandra pelo convívio, risadas e auxílio em vários momentos na realização deste trabalho.

A Caren Regina Cavichioli Lamb especialmente, pela importante e indispensável colaboração, direcionamento, disponibilidade às discussões e amizade.

Ao Amauri pelo estímulo e apoio desde a primeira hora.

A secretária da Pós-graduação em Fitotecnia Marisa Carvalho Bello

A Adriana e Mônica pelo carinho e correções do português.

A Professora Luiza Pereira e a Hugo pela colaboração e ajuda na interpretação das análises de PCR em tempo real.

A CEFAV por oferecer-me um lugar para morar e também milhares de amigos.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

CARACTERIZAÇÃO DA MUTAGÊNESE POR INSERÇÃO DO RETROTRANSPOSON *TOS17* EM GENÓTIPOS DE ARROZ ^{1/}

Autor: Flavia Vanina Ferreira

Orientador: Prof. Marcelo Gravina de Moraes

Resumo

O aumento do potencial produtivo da cultura de arroz via melhoramento genético está principalmente relacionado ao rendimento, a qualidade de grãos e a obtenção de plantas resistentes a doenças e pragas. Neste caso, deve ser explorada a variabilidade genética natural ou induzida através de agentes mutagênicos físicos, químicos ou biológicos. A vantagem do uso de mutagênicos biológicos, como os transposons e os retrotransposons, é que ao serem inseridos podem interromper um gene causando uma mutação. Esta retrotransposição deixa uma marca que possibilita a identificação molecular do local de inserção. No presente trabalho, foi utilizada a estratégia de mutagênese insercional através de eventos de transposição do retrotransposon *Tos17*, induzido por cultura *in vitro*. A análise de diferentes genótipos de arroz é muito importante para avaliar se a transposição ocorre de forma similar em genótipos distintos. Foram avaliados calos embriogênicos de cultivares que têm um histórico de variabilidade genética em homozigose, linhagens obtidas através de cruzamentos com espécies silvestres e ecótipos de arroz vermelho, submetidos a 6 meses de cultura *in vitro*. O método escolhido para avaliar o número de cópias de *Tos17* em calos embriogênicos foi a quantificação relativa por PCR em tempo real. A identificação dos genes mutados pela inserção do retrotransposon foi feita através do isolamento e amplificação das seqüências que flanqueiam os insertos de *Tos17*. O resultado deste experimento indica um aumento no número de cópias de *Tos17* em 8 dos 21 genótipos avaliados. O seqüenciamento dos fragmentos de DNA que flanqueiam os insertos do retrotransposon *Tos17*, indicaram alta similaridade com seqüências genômicas não codificantes de arroz.

^{1/}Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (74p.) Março, 2006.

CHARACTERIZING OF THE MUTATION FOR INSERTION OF RETROTRANSPOSON *TOS17* IN GENOTYPES OF RICE ^{1/}

Author: Flavia Vanina Ferreira

Adviser: Prof. Marcelo Gravina de Moraes

Abstract

The increase of the rice crop potential through genetic improvement is related mainly to the yield, grain quality, and plant disease and insect resistance. In this case, natural genetic variability should be exploited or induced through physical, chemical, or biological mutagens. The advantage of using biological mutagens, like transposons and retrotransposons, is that their insertion interrupts a gene causing a mutation. This retrotransposition provides a tag that enables the molecular identification of the insertion site. In the present work, it was used the strategy of insertional mutations through events of transposition of the retrotransposon *Tos17*. The analysis of different genotypes of rice is very important to evaluate whether the transposition occurs in a similar fashion among them. Cultivars that have a history of genetic variability in homozygosity, breeding lines derived from crossings with wild species, and ecotypes of red rice were evaluated. Embryogenic callus of all those genotypes were submitted to 6 months of tissue culture. The method chosen to evaluate the number of copies of *Tos17* from embryogenic callus was the relative quantification by real time PCR. The identification of the mutated genes by the insertion of retrotransposon was performed by the isolation and amplification of flanking sequences of *Tos17* insertions. The results of this experiment indicate an increase in the number of copies of *Tos17* in 8 out of 21 genotypes. Sequencing DNA fragments flanking the retrotransposon *Tos17* insertions indicates high similarity with genomic non coding sequences of rice.

^{1/}Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (74p.) March, 2006.

SUMÁRIO

	Página
1 . INTRODUÇÃO	1
2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Aspectos genéticos do arroz.....	5
2.2. Genômica estrutural.....	8
2.3. Genômica funcional	9
2.4. Variabilidade genética.....	10
2.5. Elementos transponíveis.....	12
2.5.1 . Estrutura e características dos retrotransposons.....	14
2.5.2 . Retrotransposons <i>Tos</i> de arroz.....	18
2.6. Cultura de tecidos de arroz.....	20
2.6.1 . Indução de calos de arroz.....	21
2.6.2 . Regeneração de plantas de arroz a partir de calos	23
2.7. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	26
3 . MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Material vegetal.....	30
3.2. Assepsia das sementes	30
3.3. Indução de calos.....	31
3.4. Regeneração das plantas	32
3.5. Extração de DNA genômico.....	33
3.6. Amplificação do retrotransposon <i>Tos17</i>	34
3.7. Quantificação do número de cópias do retrotransposon <i>Tos17</i>	35
3.7.1 . Análise estatística	37
3.8. Análise das regiões flanqueadoras dos insertos de <i>Tos17</i>	37
4 . RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Indução de calos.....	41
4.2. Regeneração de calos	44
4.3. Identificação da presença do retrotransposons <i>Tos17</i> por PCR.....	49
4.4. Análise do número de cópias de <i>Tos17</i> por PCR em tempo real	51
4.5. Análise das regiões que flanqueiam os insertos de <i>Tos17</i>	60

5 . CONCLUSÕES	64
6 . REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7 . VITA	74

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Espécies do gênero <i>Oryza</i> , número de cromossomos e grupo do genoma	7
2. Genótipos avaliados e providos pelo Instituto Riograndense do Arroz-UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2004.....	31
3. Número de calos embriogênicos e plantas regeneradas* - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.	42
4. Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) obtidos de <i>Tos17</i> e ferritina, das amostras tratadas e não tratadas e $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos diferentes genótipos - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.....	54
5. Média do número de cópias do retrotransposon <i>Tos17</i> nos genótipos avaliados, após 6 meses de cultura <i>in vitro</i> - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.	57
6. Análise comparativa dos clones seqüenciados - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.....	62

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Esquema da amplificação das seqüências que flanqueiam o gene mutado.....	39
4. Calo embriogênico de CNAi 9930 com 30 dias no MR3 - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.	45
5. Plantas regeneradas de arroz do genótipo IRGA 421 com 30 dias no MR1 - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.	45
6. Calos necrosados do genótipo CNAi 9934 - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.....	46
7. Plantas em fase de aclimação - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.....	48
8. Plantas regeneradas após aclimação - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.....	48
9. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de Tos17 - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.	50
10. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de Tos17. A - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.....	51
11. Gráfico do cálculo da eficiência da amplificação do gene de interesse e controle endógeno - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.....	52

12. Perfil eletroforético do produto da amplificação por PCR de <i>Tos17</i> e de ferritina - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.	56
13. Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados por PCR a partir das seqüências flanqueadoras dos insertos <i>Tos17</i> - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.	61

1. INTRODUÇÃO

O arroz, cujo cultivo ocorre em todos os continentes, destaca-se por fazer parte da dieta básica da população mundial, além de ocupar a terceira posição em produção e área de cultivo. O continente asiático concentra 90% da produção e consumo, e é responsável por 5% das importações e 62% das exportações mundiais. A América do Sul é a segunda maior produtora e a terceira maior consumidora de arroz. O Brasil é o maior produtor da América do Sul, responsável por 54% da produção, seguido da Colômbia, com 9,4%. No Brasil, 62% da produção de arroz provém do sistema irrigado, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor, além de ser considerado estabilizador da safra nacional por apresentar produções estáveis (Comissão de Agricultura, Pecuária e Cooperativismo, 2002).

Recentes avanços no conhecimento da genética de arroz vêm ocorrendo em função do aprimoramento de técnicas de cultura de tecido, da disponibilidade de mapas moleculares de alta resolução e, principalmente devido ao projeto de seqüenciamento do genoma do arroz. Estes avanços, e o reduzido tamanho do seu genoma de 430 Mb, fazem do arroz o principal modelo para o estudo em monocotiledôneas e proporcionam informações importantes que podem ser utilizadas por diversos sistemas biológicos.

Por outro lado, o aumento do potencial produtivo da cultura de arroz via melhoramento genético está relacionado ao aumento de resistência dos genótipos a estresses bióticos, como doenças e insetos pragas, à tolerância a estresses abióticos, como ao frio, à salinidade, à toxidez pelo ferro, além do uso de cultivares tolerantes a herbicidas (Melhoramento de Arroz, 1989). Os genes responsáveis por essas características podem ser facilmente introduzidos nos cultivares em uso a partir do emprego de metodologias avançadas, como cultivo de anteras, marcadores moleculares e engenharia genética.

Das 45.000 seqüências gênicas codificantes deduzidas do genoma de arroz, somente 25% delas possuem função determinada ou são similares a genes conhecidos em outras espécies. Deste modo, o seqüenciamento do genoma do arroz ainda fornece pouca informação ao melhoramento genético da cultura, pois se desconhece a função útil e a variabilidade existente na maioria dos genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas e nas interações das mesmas com o ambiente e com outros organismos.

Estudos de genômica funcional que visam determinar a função de genes através de análises *in vivo* por genética direta e reversa fornecem importante informação sobre as possíveis participações de genes em processos biológicos. Estes métodos serão responsáveis pela transformação dos dados obtidos do seqüenciamento em informação útil ao melhoramento genético.

Outro aspecto importante é a necessidade de variabilidade genética para o melhoramento da cultura do arroz a fim de incrementar o rendimento de

grãos, melhorar a qualidade desses grãos e obter resistência a doenças e pragas. Neste caso, deve ser utilizada a variabilidade genética natural ou induzida através de agentes mutagênicos físicos, químicos ou biológicos.

A vantagem do uso de mutagênicos biológicos, como os transposons e os retrotransposons, é que ao serem inseridos e interromperem um gene causando uma mutação, eles deixam uma marca que possibilita a identificação molecular do local de inserção e, conseqüentemente, permitem a avaliação do gene responsável pelo fenótipo resultante. Além disso, as plantas portadoras das mutações não são transgênicas, como as geradas por outros métodos de mutagênese insercional, o que dispensa os cuidados relacionados à biossegurança durante a etapa de avaliação do mutante, bem como no seu uso comercial no futuro. A identificação e a detecção de possíveis genótipos doadores de retrotransposons pode ser uma ferramenta útil para a introdução de variabilidade genética nas populações de arroz.

Por outro lado, a presença de variabilidade genética devido a eventos de retrotransposição em linhagens avançadas, com alto grau de homozigose é indesejável. Neste caso, a identificação de genótipos com a presença de retrotransposons ativos poderia constituir-se em uma ferramenta de eliminação de genótipos instáveis.

No presente trabalho, a estratégia de mutagênese insercional foi empregada através de eventos de transposição do retrotransposon *Tos17*, com os objetivos de avaliar a ocorrência, e incremento de inserções destes retrotransposons, e identificação de genes mutados pela sua inserção.

Foram avaliados cultivares que têm um histórico de variabilidade genética mesmo em homozigose, linhagens obtidas através de cruzamentos amplos com espécies silvestres e também ecótipos de arroz vermelho.

No futuro, o método estudado neste projeto poderá ser utilizado na geração de mutantes e no descobrimento e caracterização de genes importantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos genéticos do arroz

O arroz é classificado como pertencente à Divisão Angiosperma, tribo Oryzae, ordem Poales, família Poaceae (Gramineae), subfamília Oryzeae, gênero *Oryza* (Lu, 1999). A espécie *Oryza sativa* L. é a de maior importância econômica no mundo. Os cultivares de arroz da espécie *O. sativa*, foram divididos em dois grandes grupos ou subespécies: *indica* e *japonica*, de acordo com sua localização geográfica e características morfológicas. Os cultivares do grupo *indica* são predominantemente cultivados em Taiwan, Java, Índia, Sri Lanka e no sul da China, enquanto os do grupo *japonica* são cultivados no Norte da China e nas Coreias do Sul e do Norte. Ambos grupos são cultivados na China Central, EUA e no Brasil (Matsuo et al., 1997; Chandraratna, 1964).

O gênero *Oryza* possui duas espécies que são cultivadas *O. sativa* L. e *O. glaberrima* Steud., e cerca de 20 espécies afines a gramíneas reunidas na família Poaceae (Tabela 1) (Khush & Brar, 2001). As espécies do gênero *Oryza* são diplóides ($2x=24$) ou tetraplóides ($2x=48$) com um número básico de cromossomos de $x=12$. A subespécie *O. sativa* L. spp. *indica* é o principal cultivo da América do Sul tendo um genoma com $2n=24$ cromossomos (Matsuo et al., 1997). Estudos genéticos, citogenéticos e moleculares demonstram a existência de cinco genomas distintos do gênero *Oryza*, denominados em nível

diplóide de AA, BB, CC, EE e FF, além de dois anfidiplóides BBCC e CCDD. O estabelecimento de um agrupamento de espécies do gênero *Oryza* baseado no genoma é dificultado pela caracterização anterior das espécies por aspectos morfológicos, os quais variam em função do ambiente (Fagundes, 2004).

Existem diferentes características agronômicas entre os genótipos do grupo *indica* e *japonica*, segundo Oka & Morishima (1997). As principais estão relacionadas à tolerância das plantas a baixas temperaturas, tolerância a seca, tolerância ao acamamento, resposta a fertilizantes, habilidade competitiva com plantas vizinhas, taxa de germinação, taxa de crescimento vegetativo, longevidade da semente e eficiência fotossintética das folhas. Neste sentido, a classificação dos genótipos de arroz nestes dois grupos indica adaptação a ambientes específicos e influencia, desta forma, as estratégias para utilização de germoplasma (Mackil et al., 1996).

No Brasil, a maioria dos cultivares de arroz irrigado utilizados são do grupo *indica*, obtidos por cruzamentos entre linhagens introduzidas principalmente do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e do International Rice Research Institute (IRRI) (Rangel et al., 1996).

TABELA 1. Espécies do gênero *Oryza*, número de cromossomos e grupo do genoma .

Complexo de espécies	Espécies	Números de cromossomos	Grupo do genoma
<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i> L.	24	AA
	<i>O. nivara</i> Sharma et Shastry	24	AA
	<i>O. rufipogon</i> Griff.	24	AA
	<i>O. breviligulata</i> A. Chev. Et Roehr.	24	AA
	<i>O. glaberrima</i> Steud.	24	AA
	<i>O. longistaminata</i> Chev. et Roehr.	24	AA
	<i>O. meridionalis</i> Ng	24	AA
	<i>O. glumaepatula</i> Studed.	24	AA
	<i>O. officinalis</i>	<i>O. punctata</i> Kotschy ex Steud.	24, 48
<i>O. minuta</i> Presl. et Presl.		24	BBCC
<i>O. officinalis</i> Wall ex Watt		24	CC
<i>O. rhizomatis</i> Vaughan		24	CC
<i>O. eichingeri</i> Peter		24	CC
<i>O. latifolia</i> Desv.		48	CCDD
<i>O. alta</i> Swallen		48	CCDD
<i>O. grandiglumis</i> (Doell) Prod.		48	CCDD
<i>O. australiensis</i> Domin		24	EE
<i>O. meyeriana</i>	<i>O. granulata</i> Nees et Arn. ex Watt.	24	GG
	<i>O. meyeriana</i> (Zoll. et Mor. ex Steud.) Baill	24	GG
<i>O. ridleyi</i>	<i>O. longiglumis</i> Jansen	48	HHJJ
	<i>O. ridleyi</i> Hook. F.	48	HHJJ
Não classificadas	<i>O. brachyantha</i> Chev. et Roehr.	24	FF
	<i>O. schlechteri</i> Pilger	48	HHKK

Fonte: Rice Genetics IV, Khush & Brar, 2001.

2.2. Genômica estrutural

O arroz possui um genoma pequeno e foi recentemente seqüenciado (Sasaki et al., 2002), por isso tornou-se um sistema modelo para a pesquisa genômica. O tamanho calculado do genoma de arroz é de aproximadamente 430 Mb, o menor entre todos os cereais, porém 3,5 vezes maior que o de *Arabidopsis thaliana*, que foi a primeira planta a ter o genoma seqüenciado. A disponibilidade de protocolos bem estabelecidos para transformação genética, os mapas genéticos e físicos de alta densidade e o alto grau de sintonia entre os genomas dos cereais, fazem do arroz um organismo modelo ideal para estudos de fisiologia, biologia molecular, genética molecular, evolução e genômica da família das gramíneas (Rensink, 2004). A relação de sintonia poderá ser utilizada para o mapeamento de genomas maiores, tendo-se o do arroz como modelo revisado em Gura, 2000.

Quatro projetos de seqüenciamento genômico do arroz foram executados até o momento. Três utilizaram o cultivar Nipponbare, da subespécie *japonica* (Goff et al., 2002), e outro o cultivar 93-11, do grupo *indica* (Yu et al., 2002). Claramente, as duas subespécies são altamente conservadas (Feng et al., 2002.; Yu et al., 2002) mesmo que sejam adaptadas a climas distintos, sendo a *japonica* de clima temperado e a *indica* de clima tropical (Rensink, 2004),

Existe uma ampla gama de ferramentas utilizadas na genômica do arroz, incluindo o seqüenciamento de alta qualidade, 4.030 clones genômicos (aproximadamente 127,76% do genoma do arroz), um grande número de cDNAs completos identificados por seqüências expressas (ESTs) (266.000),

tecnologias de microarranjos de cDNAs, linhagens mutantes, marcadores moleculares e mapas físicos e genéticos (Yu, 2002; Tyagi, 2004; Rensink, 2004). Estima-se que o arroz apresenta aproximadamente 45.000 genes codificantes de proteínas, além de outros 11.000 elementos de transposição.

A genômica comparativa estrutural e funcional permite estimar a similaridade da organização biológica entre distintos organismos (Appels et al., 2003). A genômica comparativa objetiva comparar a organização de genomas relacionados, transferir informações de espécies modelo para outros organismos e integrar a informação para permitir a localização e a expressão de genes (Appels et al., 2003; Tyagi, 2004). Os esforços empregados para a descoberta das seqüências dos genes e das regiões intergênicas do genoma do arroz, proporcionarão o entendimento da expressão gênica, replicação do DNA, organização dos cromossomos, recombinação, especialização e evolução (Khush & Brar, 2000). O próximo passo será a análise funcional das seqüências geradas pelo Projeto Internacional de Seqüenciamento do Genoma do Arroz (IRGSP) e pelas empresas privadas.

2.3. Genômica funcional

A genômica funcional busca identificar a função de genes e descobrir quando e como produtos gênicos produzem os caracteres. Os métodos atuais de genômica estrutural, uma vez que se concentram nos caracteres controlados por um ou por poucos genes, muitas vezes proporcionam uma informação ainda muito limitada (Jeon & An, 2001). Já a genômica funcional examina as interações entre milhares de produtos gênicos

para determinar quando e porque se expressam certos caracteres, quais conjuntos de genes são especificamente responsáveis por essa expressão e sob quais condições esta ocorre. Estas informações permitem que sejam desenvolvidos cultivares com combinações de caracteres desejados (Enoki, 1999, Jeon & An, 2001). O maior desafio na era pós-genômica, está na descoberta de métodos sistemáticos para associar funções biológicas aos genes seqüenciados. Nesse contexto, a análise funcional do genoma, além dos dados provenientes do transcriptoma e do proteoma, serão importantes.

Diversas técnicas de análise funcional são desenvolvidas para a análise *in planta* sendo ferramentas mais diretas para o descobrimento de novas funções gênicas. Entre essas, podem ser citadas a utilização de marcadores moleculares, silenciamento de genes induzido por vírus (VIGS) ou por outros RNAs interferentes, nocautes de genes causados por inserções de T-DNA e por elementos genéticos móveis como os transposons e retrotransposons (Tyagi & Mohanty, 2000; Yazaki et al., 2004).

2.4. Variabilidade genética

O melhoramento genético de plantas somente é alcançado a partir do momento em que existe variabilidade genética. No caso do arroz irrigado, existe uma limitação da variabilidade, em conseqüência do estreitamento da base genética. Provavelmente, isto esteja contribuindo para a dificuldade de ultrapassar patamares de produtividade (Lopes, 2001). Em estudos realizados com base na genealogia verificou-se que 86 % dos genes dos cultivares de arroz produzidos no Rio Grande do Sul derivam de apenas seis ancestrais,

oriundos de Deo Geo Woo Gen, Cina, Lati Sail, Geo Tze, Mong Chim Vang A, Belle Patna (Rangel et al., 1996).

Em plantas regeneradas por meio de cultura de tecidos, freqüentemente podem surgir indivíduos que se distinguem da planta original em um ou mais caracteres estáveis e transmissíveis aos descendentes. As causas prováveis que induzem esse fenômeno são várias e de natureza bastante distinta, como: variação preexistente, mutação nuclear ou citoplásmica, transposons e retrotransposons, poliploidia ou outras aberrações cromossômicas e recombinação mitótica.

Para a cultura do arroz, são utilizados diferentes processos para a introdução de características favoráveis nos grãos dos novos cultivares a serem lançados. As características do grão são prioritárias no processo de seleção das plantas, dada a sua importância na definição de lançamento de novos cultivares para plantio comercial. Os métodos convencionais de melhoramento têm sido muito utilizados e, embora bastante eficientes, requerem longos prazos para obtenção de resultados concretos. Métodos não-convencionais como mutações induzidas por elementos transponíveis se apresentam como uma alternativa de melhoramento, dada sua rapidez, segurança e economia de tempo e recursos (Rangel & Zimmermann, 1998; Sant'ana et al., 2001). Em função disso, a mutagênese é desejável em programas de melhoramento, pois desempenha um papel importante na geração da biodiversidade.

2.5. Elementos transponíveis

No final dos anos 40, Bárbara McClintock identificou, pela primeira vez, no milho, elementos genéticos (denominados então de “elementos controladores”) que mudavam de posição dentro do genoma dessa planta, afetando o funcionamento dos genes onde se inseriam (McClintock, 1956).

Elementos que estão presentes nos cromossomos do milho servem para controlar a atividade gênica e para induzir, no sítio onde está o gene, modificações herdáveis que afetam a função. Estes elementos foram descobertos porque não permanecem em um local determinado dentro do cromossomo. Podem tanto aparecer como desaparecer de determinados sítios (Bennetzen, 1996).

Um transposon pode ser caracterizado como uma partícula extracromossomal que pode acoplar-se ou, de alguma forma, exercer sua influência em diferentes posições do cromossomo, afetando a atividade dos genes situados nessas posições. Segundo McClintock (1956), a transposição dos elementos controladores poderia ocorrer por mecanismos desconhecidos, produzidos durante a replicação cromossômica ou ainda ser uma consequência da mesma.

Pode-se denominar de elementos transponíveis ou transposons a um conjunto de segmentos lineares de DNA, que são capazes de mudar de posição dentro do genoma, independentemente da homologia entre a região genômica onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam. Vários tipos de elementos de transposição foram identificados em diferentes genomas. Juntos, esses elementos podem representar até cerca de 10% do DNA

genômico (Passaglia, 2003). Os transposons variam em tamanho, entre poucas centenas a milhares de pares de bases e contêm um ou mais genes que codificam enzimas específicas para sua própria transposição (Lewin, 2000; Jiang et al., 2003).

A regulação dos elementos transponíveis é variável entre as diferentes espécies e pode também variar entre os indivíduos da mesma espécie, devido a efeitos maternos e a diferenças genômicas específicas (Bingham & Zachar, 1989). Há evidências de que a manutenção destes elementos nas populações é resultante de um equilíbrio entre o aumento transposicional em número de cópias e algumas forças opostas, tais como auto-regulação, seleção contra inserções mutacionais e indução de rearranjos cromossômicos deletérios por recombinação desigual (Devos et al., 2002; Bennetzen et al., 2005).

Os elementos transponíveis se classificam em dois grupos segundo os mecanismos de transposição: classe I e classe II (Kumar, 1999). Entre os elementos da Classe I, estão os retrotransposons e retroposons, que se movem via um intermediário de RNA e induzem mutações estáveis (Hirochika, 1997). Os elementos da classe II, denominados de transposons, são seqüências de DNA que se movem via um intermediário de DNA. Exemplos deste grupo podem ser encontrados no milho, tais como os elementos transponíveis *Ac/Ds*, *Spm*, e *Mu*; assim como o elemento *Tam* de boca-de-leão. Todos são responsáveis por mutações instáveis, e são amplamente estudados como uma ferramenta genética e molecular para análises de genes.

Os retrotransposons são funcional e estruturalmente diferentes dos transposons. Possivelmente estão envolvidos na duplicação de genes como também na regulação da expressão de gênica (Jeon & An, 2001; Hirochika, 2004).

2.5.1. Estrutura e características dos retrotransposons

Os elementos móveis denominados de retrotransposons são ubíquos nas plantas. Eles estão presentes em grande número de cópias na maioria das plantas, devido à geração de novas cópias via um intermediário de RNA que é convertido em DNA extracromossômico pela enzima transcriptase reversa e da re-inserção em outro local do genoma (Bingham & Zachar, 1989; Blanchard & Schmidt, 1995). O modo de replicação dos retrotransposons pode rapidamente incrementar o número de cópias deles no genoma e gerar um aumento de tamanho do genoma das plantas (Kumar, 1996; San Miguel & Bennetzen, 1998). Os retrotransposons podem gerar mutações por inserção intragênica ou próximo de genes. Essas são geralmente mutações estáveis, porque eles se transpõem via replicação e a suas seqüências são retidas no sítio de inserção (Kumar, 2001). A transposição não é randômica, ela é controlada pelos próprios retrotransposons, por sinais do genoma hospedeiro e por fatores externos. Estresses ambientais, em particular, estimulam a expressão ou transposição de elementos móveis em leveduras, animais e em plantas (Grandbastien et al., 1997).

As propriedades ou características dos elementos transponíveis sugerem que eles são DNAs “egoístas ou parasitas” (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980). Eles são expressos e estão sujeitos às mesmas regras que os genes do genoma hospedeiro. Há milhões de anos, ocorrem íntimas relações entre retrotransposons e as plantas hospedeiras, co-evoluindo para regular a transposição e especificidade de inserção, aumentando a sobrevivência do indivíduo (Kumar & Bennetzen, 1999). Segundo Bennetzen (2005), a supressão da atividade dos retrotransposons pode ocorrer através de deleções de partes do genoma, pela exposição a agentes ambientais que geram quebras dos cromossomos que ativam os mecanismos de reparo do DNA, pela seleção contra novos rearranjos, pela metilação do DNA e pelo silenciamento da expressão gênica por degradação do mRNA.

Os retrotransposons possuem em suas extremidades seqüências curtas invertidas e geram repetições diretas no sítio de inserção. Retrotransposons são a classe mais abundante e difundida de elementos transponíveis em eucariotos, classificados em retrotransposons do tipo *LTR*, que possuem longas repetições terminais (*LTR*), e retrotransposons do tipo *não-LTR* sem repetições terminais longas (Bennetzen, 1996).

Os retrotransposons tipo *LTR* são sub-classificados nos grupos *Ty1-copia* e *Ty3-gypsy*, os quais diferem entre si em estrutura e produto codificado por seus genes (Xiong & Eickbush, 1990). Os retrotransposons de *Ty1-copia* estão presentes em todos organismos do reino vegetal, em espécies que variam desde algas unicelulares até angiospermas (Flavell et al., 1974; Voytas, et al., 1990). São encontrados comumente em número grande de cópias,

chegando até um milhão por núcleo haplóide em plantas com genomas grandes (Leeton & Smyth, 1993; Pouteau et al., 1994; Bennetzen, 1996; San Miguel et al., 1996; Kumar et al., 1997; Kunze et al., 1997).

Os retrotransposons do tipo LTR têm longas repetições terminais em orientação direta em cada extremidade, podem ter um tamanho de 0,1 a 5 Kb, terminam em repetições invertidas curtas, usualmente 5'-TG-3' e 5'-CA-3' e não codificam para proteínas conhecidas. No interior dos LTRs encontram-se regiões U3, R e U5 que contêm sinais de iniciação e terminação da transcrição (Kumar & Bennetzen, 1999). Os retrotransposons LTRs codificam para três genes principais, denominados *gag*, *pol* e *int*, transcritos numa só fita de mRNA com uma estrutura "5'-R-U5-PBS - região codificante -PPT-U3-R-3'". R, U5, PBS, PPT e U3 constituem-se em RNAs repetitivos. As proteínas codificadas por *gag*, *pol*, e *int* são sintetizadas como uma poliproteína que logo é clivada em peptídeos funcionais por uma protease. *Gag* codifica para uma proteína que envolve a maturação e o empacotamento do RNA do retrotransposon, além de proteínas para a integração ao genoma hospedeiro; *pol* codifica para uma transcriptase reversa e uma RNase-H requerida para a replicação/transposição do retrotransposon; e *int* codifica para uma integrase necessária para que o retrotransposon, através de um fragmento de DNA, possa incorporar-se no genoma hospedeiro em um novo local (Kumar & Bennetzen, 1999).

Os retrotransposons assemelham-se estruturalmente aos retrovírus. Ambos contêm o gene *pol*, o qual codifica a transcriptase reversa. Entretanto, os retrotransposons não codificam as proteínas estruturais dos vírus e o seu RNA

nunca é empacotado em partículas virais. Em muitos aspectos, esses elementos genéticos móveis podem ser considerados como retrovírus defectivos (Havecker et al., 2004).

A. thaliana contém uma família de retrotransposons, *Ta1-10*, a qual constitui 0,1% do genoma da planta. Embora esses elementos possuam as seqüências necessárias para a sua transposição não está ainda demonstrado que eles sejam capazes de realizá-la. O genoma do fumo contém o retrotransposon *Tnt1*, o qual foi isolado após a sua transposição e inativação do gene que codifica a enzima nitrato redutase. Plantas pertencentes à família Liliaceae possuem um retrotransposon denominado *del*, existindo mais de 13.000 cópias no genoma de *Lilium longiflorum*. Já em arroz, foram identificados 3 famílias de retrotransposons denominadas de *Tos*, *RIRE3*, *p-SINE1* (Kumar & Bennetzen, 1999).

Retrotransposons como *Tnt1* ou *Ta1* são similares em seqüência a um retrotransposon de *Drosophila melanogaster* conhecido como *copia*, sugerindo que eles possam ter sido transmitidos horizontalmente de insetos para plantas (revisado em Passaglia, 2003).

No caso dos retrotransposons *Tnt1* e *Tto1* de fumo, a expressão é também ativada por vários tipos de manipulações em laboratório, tais como em isolamento de protoplastos, cultura de células, fermentos, adição de metil jasmonato, cloreto de cobre e ácido salicílico. Já os retrotransposons *Tos* de arroz são induzidos em cultura de células e calos (Grandbastien, 1998).

2.5.2. Retrotransposons *Tos* de arroz

Até o momento, foram identificados 32 membros da família de retrotransposons *Tos* em arroz (*Tos1* – *Tos32*). A ativação de retrotransposons durante a cultura de tecidos indica que a ocorrência de mutação somaclonal, freqüentemente observada, pode ser o resultado da inserção de retrotransposons (Hirochika et al., 1993). Sob condições normais estes retrotransposons são aparentemente estáveis. No entanto, os retrotransposons *Tos10*, *Tos17* e *Tos19* (Hirochika et al., 1996), foram ativados após a transcrição durante cultivo *in vitro* em arroz. A transposição de *Tos17* é regulada principalmente em nível de transcrição e a sua ativação é responsável, em parte, pelas alterações observáveis em plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos (Liu et al., 2004).

Um dos métodos utilizados para análise funcional é a genética direta, utilizando *Tos17* como uma ferramenta para localizar, identificar e determinar a função de genes. A clonagem de genes por “gene tagging” tem sido realizada com sucesso em arroz com *Tos17*. Uma cópia de *Tos17* causando uma mutação pode ser identificada em gel de DNA e o gene mutado pode ser caracterizado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Kumar & Hirochika, 2001) e seqüenciamento das regiões que flanqueiam a inserção (Ochman, 1988). Outra estratégia de utilização de *Tos17* é através da genética reversa, onde a seleção das inserções é efetuada utilizando uma combinação de oligonucleotídeos iniciadores baseados em determinados genes de interesse e no retrotransposon *Tos17*.

A primeira evidência direta da viabilidade da seleção por PCR usando *Tos17* foi através da busca de um mutante do gene homeobox (*OSH15*) (Sato et al., 1999). Linhagens de arroz com alteração do gene codificante para o fitocromo A (*phyA*) também foram isoladas de populações mutantes induzida por *Tos17* usando um sistema de análises de grupos de DNAs em três dimensões. Em outro estudo, através da seleção de mutantes vivíparos foram identificadas inserções de *Tos17* nos genes da zeaxantina epoxidase (*OsABA1*) e da translocase independente de sec (*OsTATC*) (Sato et al., 1999; Agrawal et al., 2001; Miyao et al., 2003).

Mais de 32.000 linhagens mutagenizadas por inserção de *Tos17* foram produzidas em arroz e mais de 8.600 locais de inserção já foram determinados por análise das seqüências flanqueadoras. A análise dos pontos de inserção no genoma de arroz revela que há uma maior probabilidade de ocorrência em regiões gênicas (exons e introns) que em regiões intergênicas, (Hirochika, 1997, Jeon & An, 2001).

A análise da distribuição de *Tos17* no genoma mostra que este tem alta preferência por inserir-se em seqüências ricas em nucleotídeos GC. Sabe-se que os genes de resistência são regiões densas com altos conteúdos de GC, explicando deste modo uma alta preferência de *Tos17* por estes genes. Esta observação demonstra que o número de inserções de *Tos17* nestes genes pode contribuir para a evolução do genoma, através da geração de variabilidade, e deste modo facilitando uma evolução rápida de mecanismos de resistência (Miyao et al., 2003).

Em contraste com outros retrotransposons de plantas, o número de cópias de *Tos17* é pequeno. Foram encontrados em média cinco cópias por genoma, variando com o cultivar de arroz. No cultivar Nipponbare, por exemplo, foram encontradas somente duas cópias. Já em plantas obtidas de cultivo de tecidos, de 5 a 30 cópias novas foram observadas em plantas regeneradas, após 3 a 16 meses de cultura (Hirochika, 2001; Ma et al., 2004). Hirochika et al (1996) observaram que o retrotransposon *Tos17* era ativado pela cultura *in vitro*, e que após de 6 meses de cultura *in vitro*, não aumentariam significativamente o número de cópias por genomas.

Existem na atualidade diversas técnicas de quantificação do número de cópias presentes no genoma, sendo uma das principalmente utilizando a PCR em tempo real.

2.6.Cultura de tecidos de arroz *in vitro*

Técnicas de biotecnologia em geral, e particularmente a cultura de tecidos, são importantes para um programa de melhoramento, já que oferecem meios de estudo de aspectos genéticos e fisiológicos, além de proporcionar oportunidades de seleção de mutantes e germoplasma de interesse.

A base do entendimento da cultura de tecidos vegetais é estabelecida pelo conceito da totipotência: qualquer célula viva vegetal, com seus complementos cromossômicos normais, é capaz de regenerar uma planta inteira. Embora a totipotência seja um fenômeno amplamente aceito nos dias de hoje, ela começou a ser comprovada com o desenvolvimento de inúmeras técnicas de cultura de tecidos que tiveram seu grande impulso apenas nas décadas de 1940, 1950 e 1960.

Um dos maiores impedimentos para o uso das técnicas de cultura de tecidos em larga escala é certa dificuldade em encontrar um protocolo adequado para a regeneração de plantas de uma determinada espécie (Mantell et al., 1995).

Diversas variáveis devem ser testadas para encontrar uma metodologia adequada tais como o tipo e concentração de reguladores de crescimento, condições do ambiente para a cultura, tipo de explante, além da própria variabilidade entre genótipos (Bhaskaran & Smith, 1990).

Uma contribuição significativa para a formulação de um meio de cultura com ampla aplicação foi realizada por Murashige & Skoog (1962). Em seu bioensaio para adaptação de reguladores de crescimento à cultura de calos de fumo eles avaliaram os constituintes do meio a fim de atingir um ponto ótimo de crescimento de calos.

Segundo Handro & Floh (1990), os principais fatores que controlam a morfogênese em cultura de tecidos são os fitoreguladores, particularmente o balanço auxina/citocinina no meio de cultura. As auxinas podem provocar respostas diversificadas de acordo com o tecido utilizado, sendo que o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é a mais usada em diversos trabalhos com cereais.

Na busca do melhor explante a ser utilizado na indução de calos, o embrião maduro em arroz tem sido uma fonte adequada (Irala, 2002).

2.6.1. Indução de calos de arroz

A partir da escolha do meio de cultura, reguladores de crescimento e tipo de explante, uma das respostas mais comuns de um tecido cultivado *in*

in vitro é a formação de um calo. Segundo Handro & Floh (1990) a retirada de um fragmento de tecido de um organismo íntegro e sua colocação em um meio de cultura que contém nutrientes e reguladores de crescimento, faz com que a capacidade de divisão seja readquirida, promovendo a formação de um calo. Estes eventos e padrões de diferenciação, de diversas maneiras, podem levar à formação de novas estruturas organizadas (morfogênese).

Entende-se por diferenciação o processo pelo qual as células tornam-se progressivamente especializadas, tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional. A indução da perda de identidade tissular ou “desdiferenciação” de explantes resulta na formação de estruturas pouco organizadas denominadas de calos (massa de células não diferenciadas), capazes de responder aos efeitos estimulantes do meio de cultura. A posterior transferência destas células, agora competentes, para um meio indutor de raízes ou gemas, por exemplo, as tornará diferenciadas (determinadas), ou seja, comprometidas com uma rota específica de desenvolvimento (revisado em Kerbauy, 1999).

As principais etapas do cultivo *in vitro* de calos embriogênicos até a regeneração de plantas são: indução, crescimento dos calos, formação de parte aérea e formação do sistema radicular.

No cultivo *in vitro* de diversos cereais, dois tipos de calos têm sido observados com maior frequência: o calo embriogênico e o calo não-embriogênico. Esses diferem basicamente pelo tamanho das células que os compõem, pela aparência e pelo potencial para regeneração de plantas (Nabors et al., 1982; Bered, 1994).

O calo embriogênico é formado por pequenas células isodiamétricas, de natureza compacta e tem apresentado alto potencial para regeneração de plantas. O calo não-embriogênico, para o qual foram verificadas baixas taxas de regeneração de plantas, consiste de longas células tubulares, de natureza friável. A indução de calos a partir de tecidos de arroz tem sido freqüentemente realizada em meio básico de Murashige & Skoog (1962), comumente denominado MS. As concentrações de 2,4-D nos meios variam de acordo com o explante e o cultivar vegetal utilizado. Valdez et al. (1997) obtiveram uma melhor indução com 2,5 mg/L de 2,4-D para diferentes cultivares de *O. sativa* subespécie *indica*.

Além do meio de cultivo básico e os reguladores de crescimento utilizados, outros fatores têm que ser mantidos constantes na indução de calos de arroz. Alguns desses fatores são: a fonte de carbono, que freqüentemente é sacarose a 3%; a temperatura utilizada nas induções de calos, a qual varia de 25 a 28°C e a ausência absoluta de luz (Guerra et al., 1999; Jan et al., 2001).

2.6.2. Regeneração de plantas de arroz a partir de calos

Para que haja regeneração, os calos devem sofrer diferenciação, sendo que a morfogênese pode ocorrer de maneira que haja uma organização morfo-anatômica peculiar de um órgão ou tecido (organogênese), ou pode gerar estruturas semelhantes a embriões zigóticos originárias de uma célula ou de um pequeno grupo delas (embriogênese somática) (Handro & Floh, 1990).

A embriogênese somática foi relatada pela primeira vez em cultura de células de cenoura (Reinert, 1958). Norstog (1970) foi o primeiro a identificar

esse fenômeno em cereais, após observar estruturas bipolares que se assemelhavam a embriões zigóticos de cevada.

Através da embriogênese somática, as células reproduzem os passos da embriogênese zigótica. É o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. O padrão de desenvolvimento de um embrião somático é livre de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, as quais ocorrem durante o desenvolvimento de um embrião zigótico (Guerra et al., 1999).

A embriogênese somática pode ser natural ou *in vitro*. No primeiro caso, células dos tecidos embrionários podem ser direcionadas para esta rota de desenvolvimento e na embriogênese *in vitro* as células em diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos e serem reprogramadas, adquirindo novas competências morfogenéticas (Yeung, 1995).

Através da organogênese, as células diferenciam-se diretamente em tecidos vasculares, formando raízes e/ou caules, sob condições apropriadas relacionadas ao equilíbrio auxina/citocinina. Existem muitas diferenças entre estes dois processos. Na embriogênese somática, a formação de um embrião ocorre a partir de uma única célula levando a uma estrutura bipolar (ápice-raiz) e não apresenta conexões vasculares com o tecido que lhe deu origem. Na organogênese, por outro lado, a origem é multicelular, a estrutura normalmente é unipolar e estabelece conexões tecido-vasculares pré-existentes no explante

que lhe deu origem (revisado em Terzi & Loschiavo, 1990; revisado em Goldberg et al., 1994).

Uma grande variação na habilidade de regeneração de plântulas *in vitro* existe entre genótipos das subespécies *indica* e *japonica* de arroz. Genericamente, os cultivares da subespécie *indica* são denominados recalcitrantes, pois apresentam baixas taxas de indução de calos e de regeneração de plantas quando comparadas com genótipos da subespécie *japonica* (Valdez et al., 1997; Shoeb et al., 2001). Recentemente, muitos problemas no cultivo *in vitro* de *O. sativa* subespécie *indica* foram resolvidos com a adequação dos meios de cultivo para o genótipo de interesse, possibilitando a regeneração a partir de embriões maduros, embriões imaturos, plântulas e de anteras (Chu et al., 1975; Jan et al., 2001; Lin & Zhang, 2005; Ge et al., 2005).

Os reguladores de crescimento e a composição dos meios de cultura, com vista à regeneração de plantas a partir de calos de arroz, variam de acordo com distintos protocolos, conforme o material vegetal e o cultivar utilizado. (Al-Khayri et al., 1996). Para a regeneração de plantas da subespécie *indica*, Irala (2002) utilizou meio MS acrescido de duas diferentes combinações da auxina ácido α -naftalenoacético (ANA) 0,05 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹ e três de citocinina benzilaminopurina (BAP) 0,5mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹ e 4 mg L⁻¹, mantidos sob um regime de 16 h de luz e 8 h de escuro.

Vários trabalhos têm demonstrado os efeitos da concentração do tipo de carboidrato nos meios de cultivo sobre a capacidade regenerativa dos tecidos vegetais (Riker & Holdebrandt, 1954; Street, 1966; Edelman & Hanson,

1971; Fridborg, 1971; Gathercole et al., 1976; Coffin et al., 1976; Yamada & Sato, 1978; Bender et al., 1987). Na embriogênese somática de diversos tecidos vegetais, foi demonstrado que a concentração de sacarose influencia nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos (revisado em Guerra et al., 1999).

2.7. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Com o avanço da biologia molecular e da biotecnologia foram desenvolvidas ferramentas mais sensíveis, úteis para o estudo de genes, com múltiplas aplicações na genética e no melhoramento de plantas. Entre estas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) se baseia na replicação *in vitro* da molécula de dupla-fita do DNA. É usada para amplificar um segmento de DNA posicionado entre duas regiões de seqüência conhecida. Dois oligonucleotídeos iniciadores (primers) são usados para uma série de reações catalisadas pela DNA polimerase. A PCR envolve a síntese de milhões de cópias de um segmento específico do DNA, cuja especificidade é determinada pela regra de pareamento de pares de bases.

Após a desnaturação, cada oligonucleotídeo iniciador se liga à seqüência alvo. Ao final de vários ciclos, a partir de uma única cópia, ocorre uma amplificação de milhões de vezes desse segmento de DNA. A principal dificuldade da PCR convencional é que a eficiência de amplificação vai diminuindo com o tempo, até que a reação atinja uma fase de saturação, na qual já não há incremento de DNA. Como a reação é do tipo exponencial, pequenas oscilações na eficiência da amplificação para cada amostra resultam

em importantes variações na quantidade de DNA obtido ao final do processo (Costa, 2004). Para superar isto, desenvolveram-se diversas técnicas como a PCR quantitativa em tempo real. Esta é uma técnica muito sensível, onde os processos de amplificação e detecção ocorrem de maneira simultânea, sem necessidade de um processo adicional de detecção. Outra vantagem é que ela utiliza sistemas fechados, reduzindo o risco de contaminação (Gachon et al., 2004; Costa, 2004). Através da detecção por fluorescência se pode medir, durante a amplificação, a quantidade de DNA sintetizado em cada ciclo, já que a emissão de fluorescência produzida é proporcional à quantidade de DNA sintetizado. Isto permite conhecer e registrar em tempo real a cinética da reação de amplificação. Os sistemas de detecção por fluorescência podem ser de dois tipos: por sondas específicas marcadas com fluorocromos denominados “TaqMan®” e por agentes intercalantes fluorescentes. Os agentes intercalantes são fluorocromos que aumentam substancialmente a emissão de fluorescência quando se unem ao DNA de dupla fita. O agente mais empregado em PCR em tempo real é o corante “SYBR® Green” (Costa, 2004).

No caso dos agentes intercalantes, o incremento de DNA em cada ciclo se reflete em um aumento proporcional da fluorescência emitida. Esta técnica apresenta vantagens em relação às sondas específicas devido a sua maior flexibilidade e menor custo. O principal inconveniente dos agentes intercalantes é sua baixa especificidade, pois se unem de maneira indistinta a produtos gerados inespecificamente ou a dímeros de oligonucleotídeos (Schnerr et al., 2001). Para obter-se maior especificidade deve-se empregar

condições de reação otimizadas e iniciar a reação de síntese de DNA sob uma temperatura elevada (*hot-start PCR*), a qual diminui amplificações inespecíficas (Huggett et al., 2005).

Para cada amostra, o ciclo no qual se começa a detectar o aumento da fluorescência é denominado de ciclo limiar (*Ct*, *threshold cycle*). O *Ct* consiste no número de ciclos necessários para que se produza um aumento de fluorescência significativo com respeito ao sinal de base ou limiar, sendo inversamente proporcional à quantidade inicial de moléculas molde (Costa, 2004). O *Ct* é determinado na fase exponencial da curva, correspondendo a meio da parte linear quando a fluorescência é representada em um gráfico logarítmico (Giulietti, 2001).

Existem dois métodos comumente utilizados para analisar dados de experimentos de PCR quantitativo em tempo real: quantificação absoluta e relativa. A quantificação absoluta é utilizada para amostras de concentração desconhecida comparada a uma curva padrão. Esta curva pode ser construída a partir de diluições seriais de uma amostra de plasmídeos de DNA, transcritos de RNA ou qualquer outra amostra de concentração conhecida de ácido nucléico. A quantificação relativa é geralmente utilizada para analisar mudanças na expressão gênica de uma amostra teste em relação a mesma seqüência em uma amostra de referência chamada de calibrador. O calibrador pode ser uma amostra controle não tratada ou uma amostra coletada no tempo zero em uma série temporal. Este tipo de quantificação fornece uma comparação exata entre o nível inicial do gene de interesse em uma amostra não tratada em relação ao nível em outra tratada, sem fornecer o número

cópias exatas do gene de interesse (User Bulletin N° 2 Applied Biosystems, 1997).

Este procedimento tem a vantagem de não necessitar a construção de uma curva padrão. Por outro lado, as eficiências de amplificação dos genes de interesse e do controle têm que ser similares para a obtenção de resultados confiáveis. Os genes controle são genes constitutivos que devem ter expressão constante em todos os tecidos em todas as fases do desenvolvimento, bem como não serem afetados pelos tratamentos experimentais. Os genes mais utilizados com esta finalidade são os codificantes de β -actina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HPRT) e 18S RNA ribossomal (Huggett et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Sementes maduras de 31 genótipos, incluindo cultivares de *O. sativa* L., linhagens de cruzamentos entre *O. sativa* e espécies silvestres do gênero *Oryza* e ecótipos de arroz vermelho oriundas de diferentes regiões do estado, foram fornecidas pelo Instituto Riograndense do Arroz (IRGA) (Tabela 2).

3.2. Assepsia das sementes

A lema e a pálea das sementes maduras foram removidas com o auxílio de uma lixa. A assepsia foi realizada em cabine de fluxo laminar horizontal através da imersão das sementes descascadas em etanol 70 % durante 3 min, seguida de 20 min de imersão em hipoclorito de sódio 4 %. Após este tratamento, as sementes foram lavadas 3 vezes em água destilada estéril e inoculadas no meio de cultivo.

TABELA 2. Genótipos avaliados e providos pelo Instituto Riograndense do Arroz-UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2004.

Nº Genótipo	Nº Génotipo
1 BR-IRGA 421	17 CT 13956-29-M-29-3-M-M-2SR-M(BG 90-2/ <i>O. rufipogon</i>)F9 (4)
2 Lemont	18 CT 13958-12-M-1-4-M-M-3 SR-M(BG 90-2/ <i>O. rufipogon</i>)F9 (5)
3 BG 90-2	19 CT 13958-12-M-1-4-M-M-4 SR-M(BG 90-2/ <i>O. rufipogon</i>)F9 (6)
4 <i>O. rufipogon</i>	20 CT 16049A-7-3-1-2-M-M-M (BG 90-2/ <i>O. glaberrima</i>) BC3F8 (7)
5 <i>O. glaberrima</i>	21 CT 16049A-7-3-1-1-M-M-M (BG 90-2/ <i>O. glaberrima</i>) BC3F8 (8)
6 CNAi 9930(BG 90-2/ <i>O. glumaepatula</i>)F7RC2	22 Arroz vermelho (Pelotas)
7 CNAi 9931(BG 90-2/ <i>O. glumaepatula</i>)F7RC2	23 Arroz vermelho (Santa Vitória do Palmar)
8 CNAi 9932(BG 90-2/ <i>O. glumaepatula</i>)F7RC2	24 Arroz vermelho (Camaquã)
9 CNAi 9933(BG 90-2/ <i>O. glumaepatula</i>)F7RC2	25 Arroz vermelho (Arroio Grande)
10 CNAi 9934(BG 90-2/ <i>O. glumaepatula</i>)F7RC2	26 Arroz vermelho (EEA Bloco B5 Porte Baixo)
11 CNAi 9935(BG 90-2/ <i>O. glumaepatula</i>)F7RC2	27 Ct 13432-189-Pi 1/2/33
12 CNAi 9936(BG 90-2/ <i>O. glumaepatula</i>)F7RC2	28 Arroz vermelho (Dom Pedrito)
13 CNAi 9937(BG 90-2/ <i>O. glumaepatula</i>)F7RC2	29 Arroz vermelho (Torres)
14 CT 13941-27-M-16-5-M-M-1 SR-M(BG 90-2/ <i>O. rufipogon</i>)F9 (1)	30 Arroz vermelho (Restinga Seca)
15 CT 13941-27-M-16-6-M-M-1 SR-M(BG 90-2/ <i>O. rufipogon</i>)F9 (2)	31 Arroz vermelho (Banhado do Colégio)
16 CT 13956-29-M-25-4-M-M-1 SR-M(BG 90-2/ <i>O. rufipogon</i>)F9 (3)	

3.3. Indução de calos

Após a assepsia, as sementes foram colocadas em placas de Petri (8 cm de diâmetro) contendo entre 20 e 25 ml de Meio de Indução de Calos (MIC) constituído pelo meio integral de Murashige & Skoog (MS, 1962), suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoacético), 3 % de

sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar. O pH da solução foi ajustado previamente à autoclavagem em 5,8 pela adição de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, conforme a necessidade. Foram distribuídas 10 sementes por placa (5 placas por genótipo), mantendo-se o embrião em contato com o meio. As sementes foram incubadas no escuro a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 6 dias. Após, foi realizada a remoção do coleótilo, da radícula e do endosperma. Os calos do escutelo foram colocados em novo MIC e mantidos neste por 6 meses, com sub-culturas a cada 21 dias.

3.4. Regeneração das plantas

Para a regeneração das plantas a partir dos calos embriogênicos, os Meios de Regeneração (MRs) foram obtidos a partir de dados do trabalho estabelecido por Irala (2002) onde se obteve sucesso na regeneração de plântulas de arroz de *O. sativa* subespécie *indica* BR-IRGA 409. Todos os MRs consistiram de MS integral suplementados com BAP (6-Benzilaminopurina) e ANA (ácido α -naftaleno acético); acrescidos de 3 % de sacarose, 0,2 % de Phytigel™ (SIGMA) ou 7 g.L^{-1} de ágar; e pH 5,8. Nestes MRs denominados de MR3, MR2 e MR1, foram utilizadas três diferentes combinações de BAP 4 mg.L^{-1} , 2 mg.L^{-1} e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$; e duas de ANA, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$. Os calos derivados de escutelos com 6 meses de cultivo, conforme anteriormente descrito, foram utilizados como explantes e transferidos para os MRs. Em cada um desses meios eles permaneceram em B.O.D a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ em presença de 15 horas de luz por um período de 30 dias. Plântulas de 1 a 2 cm de comprimento obtidas nos MRs foram transferidas para um Meio de Alongamento (MA)

constituído do meio MS com a metade das concentrações de sais e 1,5 % sacarose, pH 5,8 (Irala, 2002).

Após a formação do sistema radicular, as plantas foram transferidas para copos plásticos com vermiculita em B.O.D a 25 ± 2 °C na presença de 15 horas de luz. As raízes foram previamente lavadas para eliminar restos de meio de cultura. Durante os 5 primeiros dias as plantas foram mantidas cobertas com um saco plástico com pequenos orifícios. Posteriormente foram retirados os sacos plásticos e as plantas mantidas em casa de vegetação.

3.5. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico de calos embriogênicos e folhas de plantas regeneradas foi realizada pelo método CTAB (Brasileiro e Carneiro, 1998). Os calos foram moídos com nitrogênio líquido e foi acrescentado 750 µL de tampão de extração (CTAB, 55 mM; Tris 100 mM, pH 8,0; EDTA, 10 mM; NaCl, 0,7 M) e 15 µL de mercaptoetanol. Após homogeneização por agitação manual durante 2 min, a mistura foi incubada a 65 °C durante 30 min. Posteriormente, foi acrescentado 520 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v:v), agitado durante 2 min e centrifugado por 10 min a 10.000 x g a 4 °C. O líquido sobrenadante foi transferido para um tubo novo, com adição de 600 µL de isopropanol (-20 °C) e 300 µL de acetato de amônio (7,5 M), e incubado a -20 °C por 30 min. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 min a 10.000 x g a 4 °C. Após ser descartado o líquido sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, e centrifugado por 5 min a 10.000 x g a 4 °C. Por fim, o precipitado foi ressuspenso em água ultra pura (Mili-Q) e armazenado a -20

°C. A pureza e a quantidade do DNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro (Smart Spec™ Plus BIO-RAD).

3.6. Amplificação do retrotransposon *Tos17*

O DNA extraído de calos embriogênicos e de plantas regeneradas foi submetido à amplificação pela PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores TOS17-F (5'-GCTTTTCTTCATGGTGATCTTCA-3') e TOS17-R (5'-GAGTAACAACAAAGTACGACC-3'), desenvolvidos a partir da seqüência da transcriptase reversa do retrotransposons *Tos17* depositada no GenBank (D85876) (Hirochika, 1996).

As reações foram realizadas em volume final de 25 µl contendo 100 ng de DNA, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em um termociclador PTC-100™ (MJ Research), através de uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 2 % contendo tampão TBE (90mM Tris, pH 8,3; 90 mM de ácido bórico; 2 mM de solução de EDTA). O marcador utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi "1kb DNA" (Invitrogen) e o gel foi submetido à coloração com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹), para a visualização do produto amplificado, e fotografado através do sistema de

fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 2D-EDAS 120).

3.7. Quantificação do número de cópias do retrotransposon

Tos17

O método escolhido para avaliar o número de cópias de *Tos17* de calos embriogênicos de arroz foi de quantificação relativa por PCR em tempo real. Foi utilizado o sistema “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystem) e as amplificações foram realizadas em um termociclador “Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System”, localizado no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O oligonucleotídeo iniciador direto utilizado para a amplificação do gene de interesse foi TOS17-F (item 3.6) e no sentido reverso o oligonucleotídeo utilizado foi TOS-R2 (5'-GCCTGCTTGAGACCATAAAGT-3'), resultando em um fragmento de 116 pb. Como gene controle, foi utilizado o gene constitutivo que codifica para ferritina. Nesse caso, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: em sentido direto FER-F (5'-ATGCTATGGAGTTGGCCTTG-3') e em sentido reverso FER-R2 (5'-GGAATTCGCTCTCAACGAAG-3'). Os oligonucleotídeos foram baseados nas seqüências AF519570 (FER-F) e AF519571 (FER-R2) depositadas no GenBank: National Center of Biology Information (NCBI, Bethesda, Md, USA). O produto da amplificação estimado foi de 237 pb.

As reações foram realizadas em duplicatas. O volume final de reação foi de 25 μL contendo 12,5 μL de “SYBR Green PCR Master Mix”, o qual contém o corante intercalante SYBR® Green, a enzima DNA Polimerase AmpliTaq Gold®, dNTPs, corante para referência passiva e outros, componentes do tampão, todos os reagentes em composição foram formuladas pelo fabricante (Applied Biosystems). Foram adicionados a esta mistura 50 ng de DNA e 300 nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (direto e reverso). As amplificações dos genes de interesse e controle foram realizadas separadamente em uma placa ótica de polipropileno com capacidade para 96 amostras (Applied Biosystems). As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial e ativação da DNA polimerase de 95 °C por 10 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min.

Como calibrador utilizou-se DNA extraído segundo item 3.5 a partir de folhas de plantas de todos os genótipos testados, que não foram submetidas ao cultivo *in vitro* (tempo zero). Para isto foram colocadas 10 sementes (3 copos por genótipo) em copos plásticos com substrato. Após duas semanas coletou-se folhas das plantas obtidas para extração de DNA.

As análises dos dados foram realizadas com o programa “7500 System SDS” (Applied Biosystem) e posteriormente exportados para planilhas do programa “Microsoft Excel” para análise mais detalhada. O método de quantificação relativa normalizada para avaliar o número de cópias de *Tos17* foi: $2^{-\Delta\Delta C_t} = (C_{t, \text{gene de interesse}/Tos17} - C_{t, \text{gene controle/ferritina}})_{\text{tempo 6}} - (C_{t, \text{gene de interesse}/Tos17} - C_{t, \text{gene controle/ferritina}})_{\text{tempo 0}}$

gene de interesse/*Tos17* – C_t , gene controle/ferritina)_{tempo 0/calibrador} (Livak & Schmittgen, 2001).

3.7.1. Análise estatística

A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) a um critério de classificação. As médias dos genótipos foram comparadas utilizando-se o programa “MINITAB® Release 14.20” através do teste de separação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

3.8. Análise das regiões flanqueadoras dos insertos de *Tos17*

A identificação dos genes mutados pela inserção do retrotransposon foi feita através do isolamento e amplificação das seqüências flanqueadoras dos insertos *Tos17* conforme descrito por Feschotte et al., 2002.

O DNA genômico (3 µg) extraído de folhas de plantas regeneradas a partir de calos embriogênicos de diferentes genótipos de arroz foi digerido com 10 U da enzima de restrição *EcoR* V (Promega) tampão D 1x (6 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,15 M NaCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT) incubada a 37°C por 2 h, clivando o DNA em fragmentos de extremidades cegas. Em seguida, foi realizada a inativação da enzima de digestão a 70°C por 15 min.

Um (1) µg de DNA digerido foi ligado a 1 µg de adaptador de DNA AD1 (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT-3'/ 3'-GGCCCGTCCA-5') pela adição de 3 U da enzima T4 DNA ligase, durante 16 h a 15°C, seguida da inativação da enzima ligase a 70°C por

10 min. O oligonucleotídeo utilizado para amplificar a partir dos adaptadores foi P1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), o qual amplifica em ambos sentidos (reverso e direto) a partir dos adaptadores, requerendo primeiramente a síntese da fitas complementar a sua seqüência.

Após, foi realizada a amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos a partir da informação da seqüência das extremidades do retrotransposon (Hirochika, 1996), denominadas de longas repetições terminais (LTR), e da seqüência dos adaptadores. As seqüências que flanqueiam o inserto *Tos17* foram amplificadas para caracterizar as regiões de inserção através de duas etapas (Figura 1).

Em ambas etapas, as reações foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 100 ng de DNA, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100TM, o material foi submetido a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 31 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 3 min; e uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados na primeira etapa foram LTR1 (5'-TTGGATCTTGTATCTTGTATATAC-3') em sentido direto e P1 em sentido reverso, e em outra reação LTR3 (5'-CCAATGGACTGGACATCCGATGGG-3') em sentido reverso e P1 em sentido direto. A segunda etapa de amplificação foi feita com oligonucleotídeos que reconhecem regiões amplificadas na primeira etapa. Assim as reações obtidas

da amplificação com LTR1 foram submetidas aos oligonucleotídeos LTR2 (5'-GCTAATACTATTGTTAGGTTGCAA-3') em sentido direto e novamente P1 em sentido reverso, e a reação obtida a partir de LTR3 aos oligonucleotídeos LTR4 (5'-CTGGACATGGGCCAACTATACAGT- 3') em sentido reverso e P1 em sentido direto.

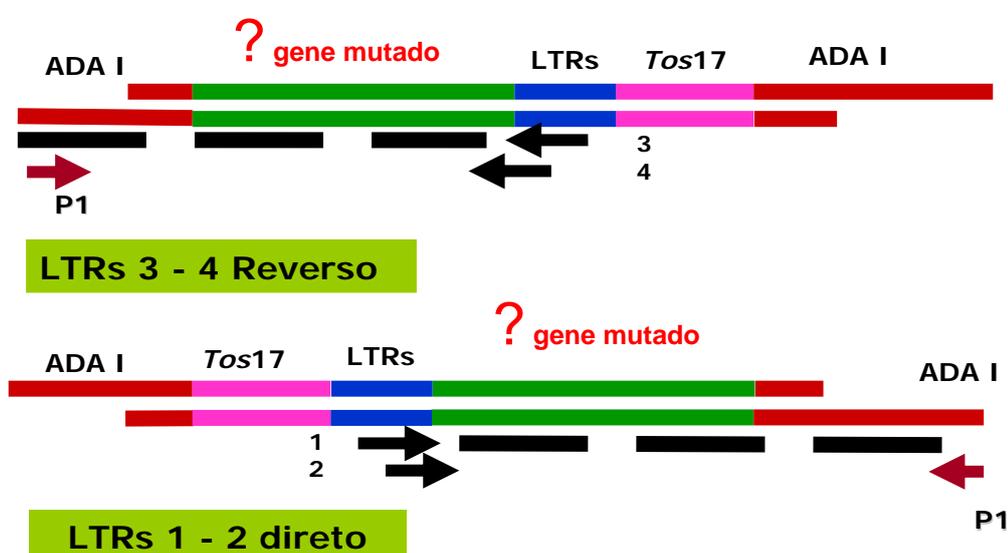


FIGURA 1. Esquema da amplificação das seqüências que flanqueiam o gene mutado.

Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo tampão TBE (90 mM Tris, pH 8,3; 90 mM de ácido bórico; 2 mM de solução de EDTA). O marcador utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi "1kb DNA" (Invitrogen) e o gel foi submetido à coloração com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), para a visualização do produto amplificado, e foi fotografado através do sistema de

fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Digital Science 2D-EDAS 120).

Os fragmentos de DNA de interesse foram isolados do gel e purificados através do sistema “Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up” (Promega), conforme instruções do fabricante. Após foram seqüenciados no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC/RS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis” no seqüenciador automático “MegaBACE” (Amersham Biosciences), utilizando 100 ng do produto de PCR e 2,5 mM do oligonucleotídeo LTR 2 ou LTR 4, conforme as instruções do fornecedor. Os eletroferogramas obtidos do seqüenciamento foram analisados através do programa “Chromas Lite” (Technelysium Pty Ltd).

Após, as seqüências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank: National Center of Biology Information (NCBI, Bethesda, Md, USA), www.ncbi.nlm.nih.gov, através do programa de BLAST (Altschul et al., 1997) para verificar a identidade do fragmento gene onde ocorreu inserção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Indução de calos

De um total de 31 genótipos utilizados no presente trabalho foram obtidos calos embriogênicos de 29 (93%). Esses, em sua fase de indução se mostraram de aspecto aquoso (Figuras 2). Calos que apresentaram sinais de necrose foram descartados. Não foram obtidos calos dos genótipos de arroz vermelho procedentes das regiões de Pelotas (RS) e Arroio Grande (RS), provavelmente por não responderem à quebra de dormência ou devido ao baixo vigor das sementes. Os restantes responderam ao meio de indução (Tabela 3 e Figura 3). O número de médio de calos obtidos por genótipo foi de 86.

Durante os 6 meses de cultura *in vitro*, os calos que apresentaram um diâmetro superior a 1 cm foram divididos em dois, e submetidos novamente ao meio de cultura, obtendo-se assim um número maior de calos para alguns genótipos. A variabilidade observada no número de calos obtidos após os 6 meses de cultura, deve-se ao fato de que determinados genótipos apresentaram calos necrosados, resultando em um número final de calos reduzido. Outro fator que contribuiu para a redução do número final de calos foram as perdas por contaminação no meio de cultura.

TABELA 3. Número de calos embriogênicos e plantas regeneradas* - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

	Génotipo	Nº de calos	Nº de plantas regeneradas
1	BR-IRGA 421	80	10
2	Lemont	130	0
3	BG 90-2	60	8
4	<i>O. rufipogon</i>	160	2
5	<i>O. glaberrima</i>	90	0
6	CNAi 9930	80	1
7	CNAi 9931	40	0
8	CNAi 9932	30	0
9	CNAi 9933	60	0
10	CNAi 9934	140	5
11	CNAi 9935	80	0
12	CNAi 9936	130	0
13	CNAi 9937	60	0
14	Ct 13941-27-M-16-5-M-M-1 SR-M (1)	90	2
15	Ct 13941-27-M-16-6-M-M-1 SR-M (2)	70	0
16	Ct 13956-29-M-25-4-M-M-1 SR-M (3)	180	0
17	Ct 13956-29-M-29-3-M-M-2 SR-M (4)	120	0
18	Ct 13958-12-M-1-4-M-M-3 SR-M (5)	70	1
19	Ct 13958-12-M-1-4-M-M-4 SR-M (6)	60	0
20	Ct 16049A-7-3-1-2-M-M-M (7)	70	5
21	Ct 16049A-7-3-1-1-M-M-M (8)	90	7
22	Arroz vermelho (Pelotas)	0	0
23	Arroz vermelho (Santa Vitória do Palmar)	30	0
24	Arroz vermelho (Camaquã)	30	0
25	Arroz vermelho (Arroio Grande)	0	0
26	Arroz vermelho (EEA Bloco B5 Porte Baixo)	90	0
27	Ct 13432-189-Pi 1/2/33	90	0
28	Arroz vermelho (Dom Pedrito)	100	0
29	Arroz vermelho (Torres)	70	0
30	Arroz vermelho (Restinga Seca)	50	0
31	Arroz vermelho (Banhado do Colégio)	140	0

*Utilizando-se como critério a presença de plântulas medindo 1 cm de comprimento após 30 dias no MR3.

O meio utilizado neste trabalho foi definido por Valdez et al. (1997), sendo o mesmo indicado para a indução e proliferação de calos de escutelo de

genótipos de *O. sativa indica* e espécies silvestres, conforme resultados apresentados na Tabela 3.

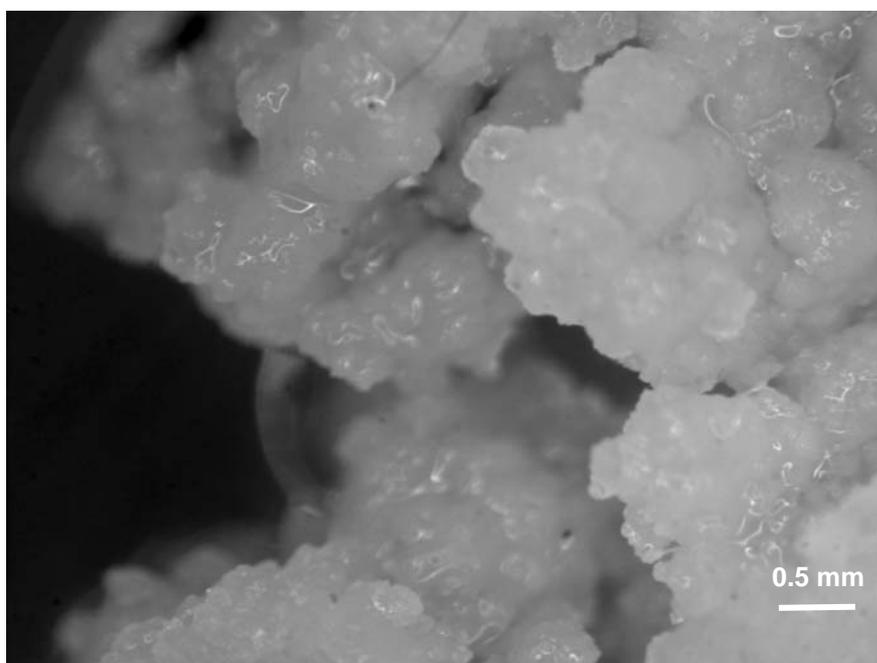


FIGURA 2. Calos embriogênicos do genótipo Lemont com 30 dias no meio de indução - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2004.

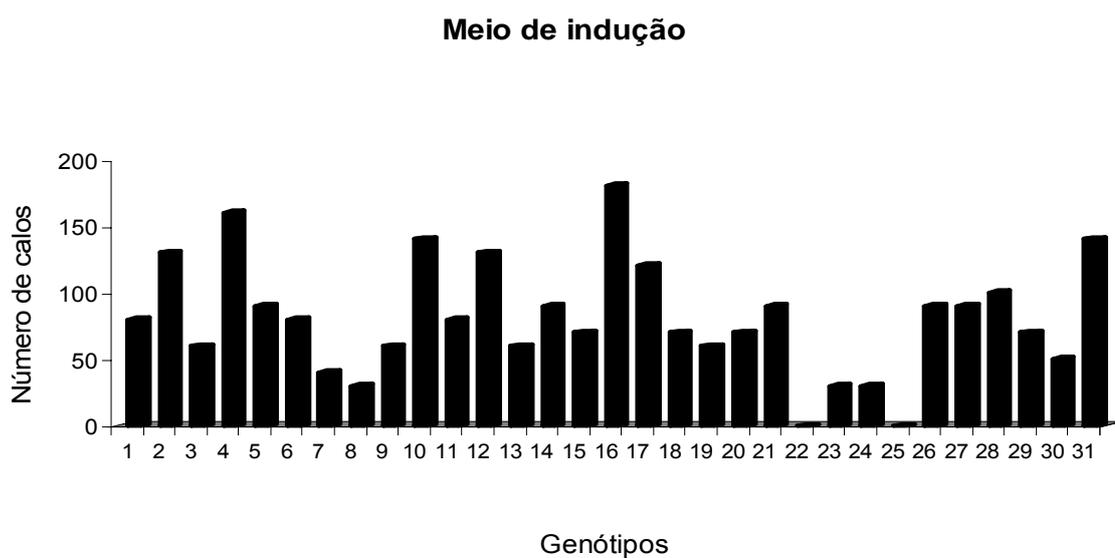


FIGURA 3. Número de calos obtidos por genótipo no meio de indução MS. Os números no eixo x representam a identificação dos genótipos de acordo com a Tabela 3 - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

4.2.Regeneração de calos

Após 6 meses de cultivo em meio de indução, procedeu-se a regeneração. Para isto, o meio elegido foi o estabelecido por Irala (2002). Os calos embriogênicos obtidos no item 4.1 foram divididos em duas partes, uma destinada à extração de DNA, e posterior identificação e análise do número de cópias dos retrotransposons *Tos17*, e a outra metade para a regeneração de plantas.

Os calos embriogênicos com coloração creme-clara (indicativa de reservas de amido) e de estruturas mais compactas são os mais propensos à regeneração, conforme observaram Sahrawat & Chand (1998). Calos com estas características foram destinados para a regeneração de plantas, em meio MR3, permanecendo 30 dias (Figura 4). Após este período, as plântulas obtidas foram transferidas para o meio MR2, o qual contém uma concentração menor de BAP e ANA (item 3.4), permanecendo por 30 dias. Posteriormente, as plântulas do MR2 foram transferidas para o meio de regeneração MR1, permanecendo também por 30 dias (Figura 5).

Os calos necrosados foram eliminados para evitar que os mesmos provocassem oxidação, e conseqüentemente, a morte das brotações (Figura 6). Foram obtidas plantas regeneradas de 9 dos 29 genótipos avaliados (31%), utilizando-se como critério a presença de plântulas medindo 1 cm de comprimento após 30 dias em MR3 (Tabela 3), obtendo-se, em média, 12 % de plantas regeneradas, dos 9 genótipos que apresentaram regenerantes.

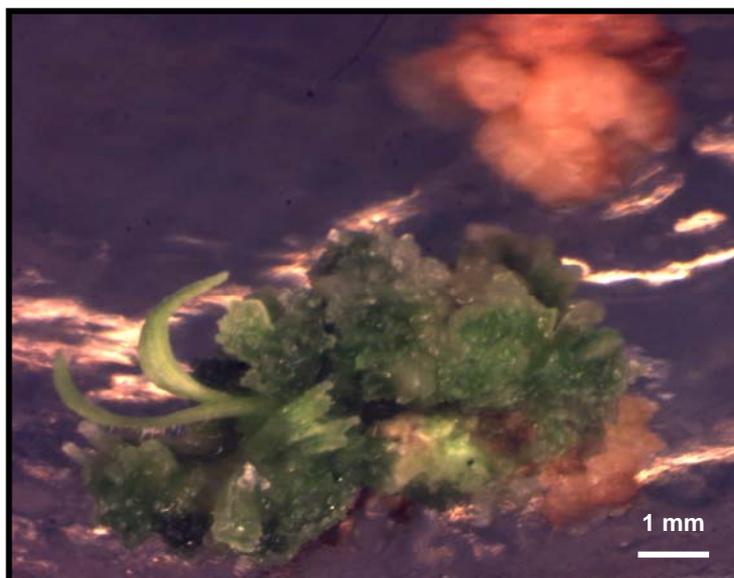


FIGURA 4. Calo embriogênico de CNAi 9930 com 30 dias no MR3 - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

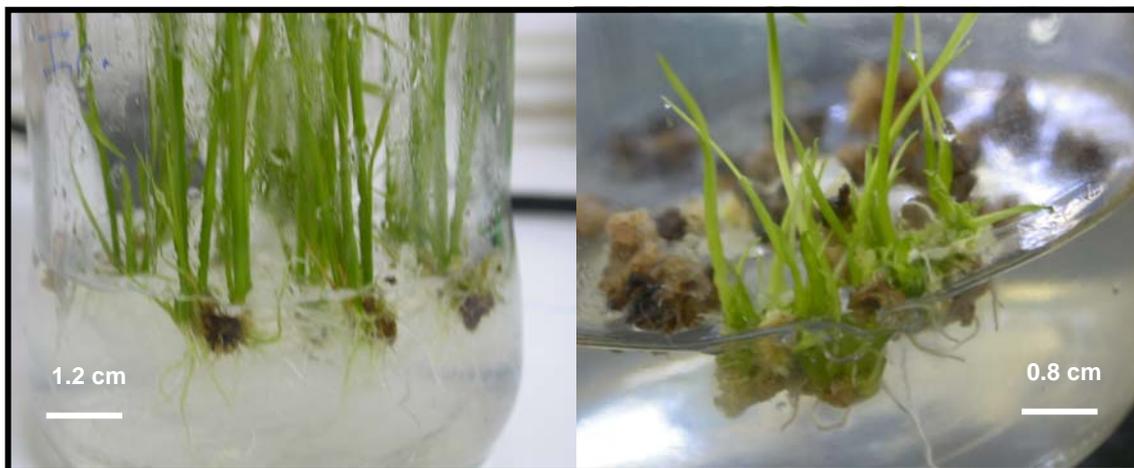


FIGURA 5. Plantas regeneradas de arroz do genótipo IRGA 421 com 30 dias no MR1 - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

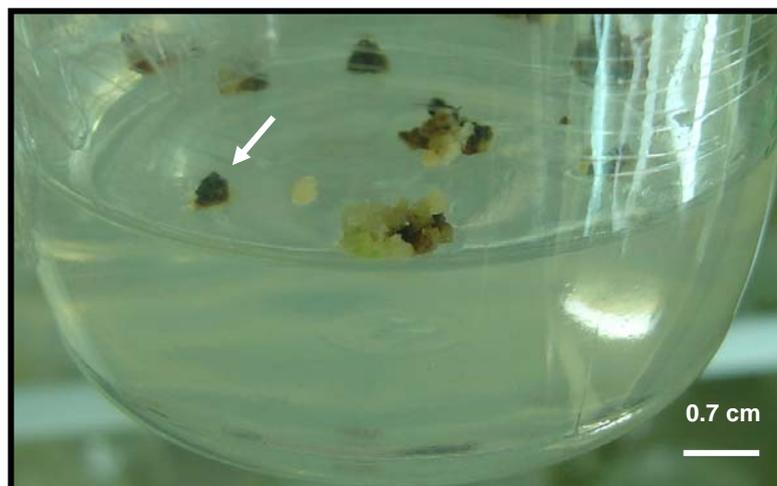


FIGURA 6. Calos necrosados do genótipo CNAi 9934 - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

O método utilizado para regeneração de calos de arroz, e outras espécies de monocotiledôneas, depende da redução da concentração de auxinas do meio de cultura. Geralmente, a capacidade de regeneração está influenciada pelo genótipo e pelos componentes tanto do meio de indução como do meio de regeneração. O ajuste dos componentes, particularmente dos fitohormônios, altera a capacidade de regeneração em arroz (Al-Khayri et al., 1996). Outros fatores a serem considerados na regeneração de plantas de arroz a partir de calos de escutelos é a fonte e a concentração de carboidratos no meio. Segundo Dode (1999) reduzindo a concentração e substituindo sacarose por maltose, é possível aumentar o percentual de regeneração. Também trabalhos realizados por Jan et al. 2001, evidenciam que a suplementação com sorbitol incrementa a osmolaridade do meio e aumenta a eficiência da regeneração. Visando a obtenção de uma melhor regeneração, foram realizados testes com sorbitol. No presente estudo não foram observadas diferenças entre meios com ou sem sorbitol em relação ao

percentual de regeneração (resultados não apresentados). Este fato pode ser explicado pela possibilidade de que plantas de arroz não possuam os mecanismos necessários para metabolizar os açúcares álcoois (sorbitol ou manitol), ao contrário de outras espécies (Coffin et al., 1976).

Segundo Jan et al. (2001) a utilização de Phytigel™ (SIGMA), em substituição ao agar, aumenta o índice de regenerantes. No presente trabalho, foi utilizado agar como agente gelificante, não obtendo-se nenhuma planta regenerada. Posteriormente, com a utilização de Phytigel™ (SIGMA), foi possível obter regeneração de plantas de alguns genótipos, confirmando esta afirmação. Finalmente, deve-se considerar que a idade do explante e o tempo de permanência no meio de indução são importantes para uma regeneração eficiente (Jan et al., 2001). Experimentos de regeneração realizados por Irala (2002) com o genótipo BR IRGA-409 mostraram claramente que os calos mantidos por períodos mais longos em cultivo *in vitro* perderam os seus potenciais regenerativos. Considerando a necessidade de cultivo *in vitro* por seis meses no presente estudo, é provável que tenha afetado negativamente a taxa de regenerantes de plantas (Tabela 3).

Após a passagem pelo meio MR1, as plantas foram transferidas para o meio de alongamento (MA) onde permaneceram por 20 dias e em seguida foram colocadas em copos plásticos com vermiculita, cobertos com um saco plástico preso ao copo (Figura 7). Durante os primeiros 5 dias foram realizados pequenos orifícios no saco plástico para permitir o contato gradativo da planta com as condições ambientais. Passados 5 dias, os sacos foram retirados. Das 42 plantas obtidas nos meios de regeneração, somente 7

sobreviveram após a fase de aclimação: 4 plantas derivadas de calos de IRGA 421 e 3 plantas do genótipo CT 16049A-7-3-1-2-M-M-M (Figura 8).

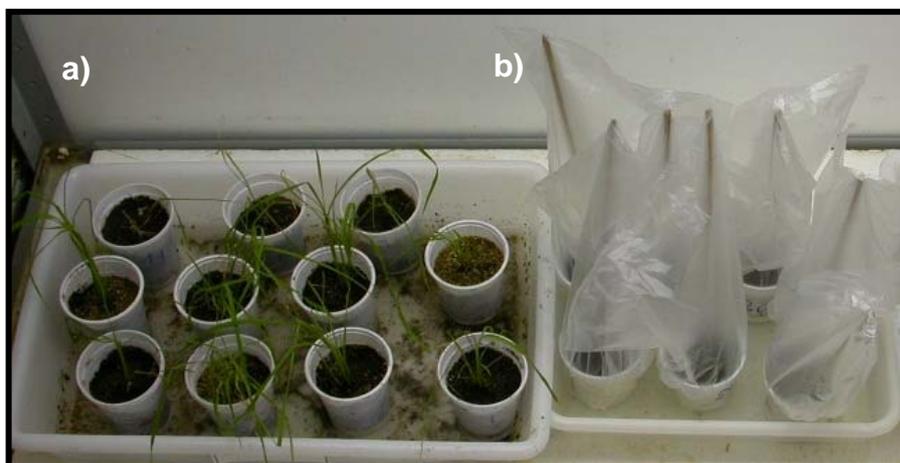


FIGURA 7. Plantas em fase de aclimação. a) plantas do genótipo IRGA 421 após a retirada dos sacos plásticos, b) plantas do genótipo CT 16049A-7-3-1-1-M-M-M (8) - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.



FIGURA 8. Plantas regeneradas após aclimação. Quatro plantas derivadas de calos de IRGA 421 e 3 do genótipo CT 16049A-7-3-1-2-M-M-M, transferidas para substrato em casa de vegetação - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

As perdas observadas, 35 plantas das 42 obtidas no meio de cultura *in vitro*, foram devido à aclimação. Este processo consiste em retirar a plântula da condição *in vitro* e transferi-la para casa-de-vegetação, tendo por objetivo superar as dificuldades que as plântulas obtidas por cultura de tecidos enfrentam quando são removidas do ambiente controlado. Esse processo é crítico, pois a plântula passa de um ambiente de baixa transpiração para outro que exige uma taxa maior. Também porque as plantas saem de um estado asséptico e ficam sujeitas ao ataque de microorganismos saprófitos e eventualmente patogênicos (Gratapaglia & Machado, 1990).

Estas plantas foram utilizadas para a extração do DNA das folhas, para identificação dos possíveis genes que sofreram a mutação pela inserção do retrotransposon *Tos17* e, também para a coleta das sementes para estudos posteriores.

Plantas regeneradas de calos podem mostrar variabilidade morfológica resultante do meio de cultura (temporárias) ou relacionadas a mutações genéticas durante o cultivo *in vitro* tais como alterações cromossômicas ou a ativação de elementos móveis como os retrotransposons (Cardone et al., 2004). As plantas regeneradas no presente estudo não apresentaram alterações morfológicas visuais.

4.3. Identificação da presença do retrotransposons *Tos17* por PCR

A partir do DNA genômico extraído dos calos e das folhas das 7 plantas regeneradas, procedeu-se à detecção da presença de *Tos17* através

da amplificação por PCR e a visualização em gel de agarose. Foi observada a presença de um fragmento de DNA de 237 pb correspondente à parte da seqüência do gene da transcriptase reversa de *Tos17* em todos os genótipos testados (Figuras 9 e 10). Estudos recentes sobre os retrotransposons de plantas, mostraram que esses além de ubíquos, são os elementos repetitivos encontrados em maior número nos genomas. Até o momento, foram identificados 32 membros da família de retrotransposons *Tos* em arroz (*Tos1* – *Tos32*), estando presente tanto em espécies silvestres como nas cultivadas (Liu & Wendel, 2000). *Tos17* é um retrotransposon presente geralmente em número muito reduzido (1 a 4 cópias), mas pode haver diferenças em relação ao número de cópias entre cultivares (Han et al., 2004).

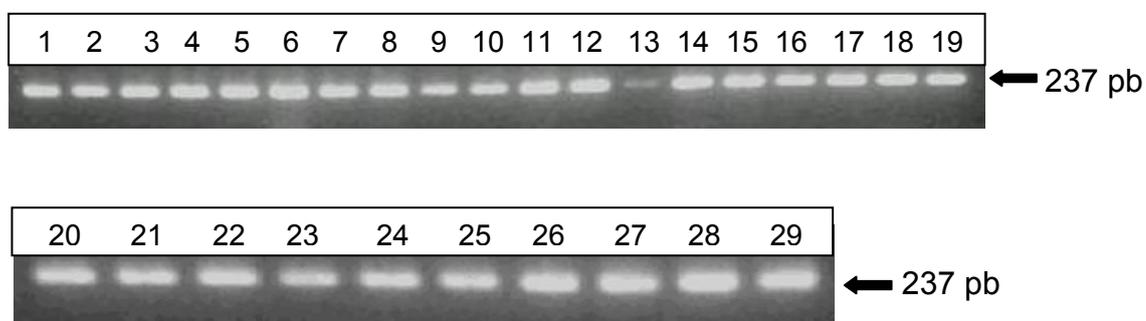


FIGURA 9. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de *Tos17*. Amplificação de DNA de calos embriogênicos de arroz dos genótipos 1-29 (Tabela 3). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.



FIGURA 10. Perfis eletroforéticos do produto da amplificação por PCR de *Tos17*. Amplificação de DNA de 7 plantas regeneradas a partir de calos embriogênicos de genótipos de arroz IRGA 421 (1-4) e CT 16049A-7-3-1-2-M-M-M (7) (5-7). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

4.4. Análise do número de cópias de *Tos17* por PCR em tempo

real

Visando avaliar o número de cópias de *Tos17* de calos embriogênicos de arroz, foi utilizado o método de quantificação relativa por PCR em tempo real, através do qual o número de cópias é detectado pelo aumento da fluorescência ao longo da PCR. Não houve germinação das sementes dos seguintes genótipos Lemont, BG-90-2, *O. rufipogon*, *O. glaberrima*, CT 13956-29-M-29-3-M-M-2 SR-M (4), CT 16049A-7-3-1-1-M-M-M (8), arroz vermelho (Santa Vitória do Palmar), arroz vermelho (EEA Bloco B5 Porte Baixo), devido provavelmente a problemas relacionados ao vigor ou a falta de resposta à quebra de dormência das mesmas. Este fato impossibilitou a análise da variação no número de cópias nestes genótipos, pois a quantificação relativa necessita de uma amostra sem a aplicação do tratamento (tempo zero) que, no caso deste experimento, foi o período de cultivo *in vitro* de 6 meses.

Primeiramente foram realizados testes de validação da técnica de quantificação relativa por PCR em tempo real. Para que neste teste se utilize a fórmula de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a eficiência de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno devem ser similares.

A avaliação da eficiência foi realizada através do cálculo do valor absoluto da inclinação da reta gerada pelos logaritmos da quantidade de DNA das amostras versus ΔC_T (C_T *Tos17* – C_T ferritina) que deve ser menor que 0,1 (User Bulletin N° 2 *Applied Biosystem*, 1997; Livak & Schmittgen, 2001). Este teste foi realizado com diferentes quantidades de DNA: 16,6 ng, 50 ng, 150 ng e 450 ng. Deste modo, observou-se um valor da inclinação de -0,8534, sendo um valor menor 0,1. A partir deste resultado, assume-se que a amplificação do gene de interesse (*Tos17*) e do gene controle (Ferritina) são similares (Figura 11).

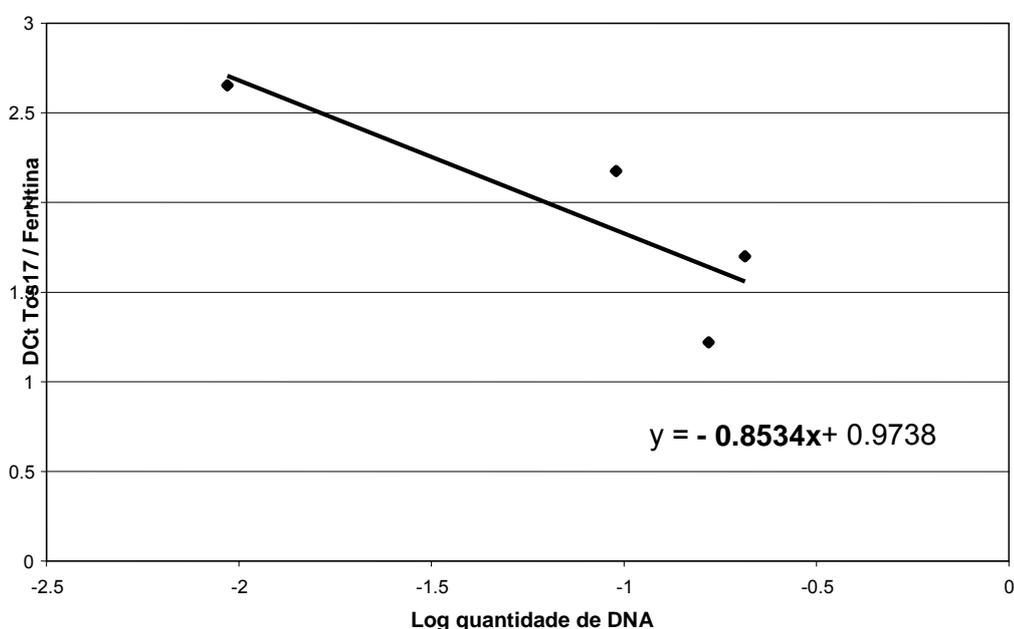


FIGURA 11. Gráfico do cálculo da eficiência da amplificação do gene de interesse e do controle endógeno - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

Outro teste realizado foi a determinação da concentração ideal de oligonucleotídeos iniciadores na reação de PCR. Foram testadas concentrações de 50 nM, 200 nM, 300 nM e 900 nM, sendo que a concentração que apresentou melhores resultados foi a de 300 nM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (direto e reverso).

Finalmente, foi realizado um teste para a determinação da melhor quantidade de DNA necessária para iniciar a reação. Foram testados 5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng e 100 ng. Este teste indicou que a melhor quantidade foi de 50 ng de DNA.

Após a realização dos testes preliminares, precedeu-se a análise da variação do número de cópias nos diferentes genótipos. Quando o número de cópias de *Tos17* foi comparado entre as amostras após 6 meses de cultivo e o calibrador (tempo zero) foi possível observar diferenças entre os genótipos analisados. Os genótipos arroz vermelho Restinga Seca e CNAi 9935 apresentaram $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 15 e 17 vezes maior, respectivamente. CNAi 9930 e arroz vermelho Banhado do Colégio 4 vezes maior, arroz vermelho Dom Pedrito, arroz vermelho Torres 3 vezes maior, CNAi 9936 e IRGA 421 2 vezes maior (Tabela 4).

A partir desta análise, conclui-se que houve um incremento no número de cópias em 8 genótipos gerados pela cultura *in vitro*. Por outro lado, o número de cópias não apresentou variação nos outros 13 genótipos avaliados neste experimento.

TABELA 4. Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP) obtidos de *Tos17* e ferritina, das amostras tratadas e não tratadas e $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos diferentes genótipos - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

Amostras	6 MESES						TEMPO ZERO						QUANTIFICACAO RELATIVA					
	Tos17			Ferritina			Tos17			Ferritina			ΔCt T6 ^a	s	ΔCt T0 ^a	s	$\Delta\Delta Ct^b$	Núm. de Cópias Tos17 ^c
	Ct	Média	DP	Ct	média	DP	Ct	média	DP	Ct	média	DP						
1 CNAi	20.83			21.17			25.37			22.26								
9930	20.89	20.86	0.04	21.69	21.43	0.37	21.78	23.58	2.54	22.22	22.24	0.03	-0.57	±0.37	1.34	2.54	-1.91	3.75
2 CNAi	22.18			22.68			19.77			20.24								
9931	22.37	22.28	0.13	22.63	22.66	0.04	19.80	19.79	0.02	20.13	20.19	0.08	-0.38	±0.14	-0.40	0.08	0.02	0.99
3 CNAi	24.01			25.34			20.62			21.31								
9932	24.06	24.04	0.04	24.88	25.11	0.33	20.74	20.68	0.08	21.11	21.21	0.14	-1.08	±0.33	-0.53	0.16	-0.54	1.46
4 CNAi	21.85			22.33			21.20			21.62								
9933	20.78	21.32	0.76	22.14	22.24	0.13	21.56	21.38	0.25	21.74	21.68	0.08	-0.92	±0.77	-0.30	0.27	-0.62	1.54
5 CNAi	23.20			23.83			21.76			21.69								
9934	23.35	23.28	0.11	23.05	23.44	0.55	21.49	21.63	0.19	22.02	21.86	0.23	-0.16	±0.56	-0.23	0.30	0.07	0.96
6 CNAi	22.27			25.49			22.88			22.53								
9935	21.58	21.93	0.49	25.60	25.55	0.08	23.41	23.15	0.37	22.80	22.67	0.19	-3.62	±0.49	0.48	0.42	-4.10	17.15
7 CNAi	25.87			27.09			24.02			24.63								
9936	25.77	25.82	0.07	27.82	27.46	0.52	23.92	23.97	0.07	24.12	24.38	0.36	-1.64	±0.52	-0.41	0.37	-1.23	2.35
8 CNAi	20.00			20.87			23.92			24.12								
9937	19.34	19.67	0.47	20.20	20.54	0.47	23.47	23.70	0.32	23.68	23.90	0.31	-0.86	±0.67	-0.20	0.45	-0.66	1.58
9 IRGA	19.68			21.18			21.90			22.51								
421	19.67	19.68	0.01	21.15	21.17	0.02	22.08	21.99	0.13	22.32	22.42	0.13	-1.49	±0.02	-0.43	0.19	-1.07	2.09
10BG 90-2/ <i>O.rufi-</i> <i>pogon</i> 1	21.98			22.07			23.60			23.80								
	21.99	21.99	0.01	22.38	22.23	0.22	23.52	23.56	0.06	23.84	23.82	0.03	-0.24	±0.22	-0.26	0.06	0.02	0.99
11BG 90-2/ <i>O.rufi-</i> <i>pogon</i> 2	23.26			22.86			24.74			23.95								
	22.85	23.06	0.29	22.24	22.55	0.44	24.19	24.47	0.39	22.39	23.17	1.10	0.51	±0.53	1.30	1.17	-0.79	1.73

a. $\Delta Ct = \mu$ de *Tos17* - μ de Ferritina , b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct T6 - \Delta Ct T0$, c. Incremento do número de cópias de *Tos17* relativo ao calibrador $2^{-\Delta\Delta Ct}$. s* (desvio standard)

$$= \sqrt{s_{Tos17}^2 + s_{Ferritina}^2} \text{ (Applied Biosystems, 1997).}$$

Continuação TABELA 4

Amostras	6 MESES						TEMPO ZERO						QUANTIFICACAO RELATIVA					
	Tos17			Ferritina			Tos17			Ferritina			ΔCt T6 ^a	s	ΔCt T0 ^a	s	$\Delta\Delta Ct^b$	Núm. de Cópias Tos17 ^c
	Ct	Média	DP	Ct	média	DP	Ct	média	DP	Ct	média	DP						
12BG 90-2/ <i>O. rufi-</i> <i>pogon</i> (3)	22.25			23.77			21.55			22.10			-0.95	±0.77	-0.19	0.39	-0.76	1.69
13BG 90-2/ <i>O. rufi-</i> <i>pogon</i> (5)	23.22			23.07			23.13			23.26			0.71	±0.74	-0.20	0.08	0.91	0.53
14BG 90-2/ <i>O. rufi-</i> <i>pogon</i> (6)	24.14			23.81			23.09			22.28			0.29	±0.14	0.29	0.52	0.00	1.00
15BG 90-2/ <i>O. glaberrima</i> (7)	23.34			23.24			21.83			22.24			-0.07	±0.22	-0.28	0.20	0.21	0.87
16Arroz vermelho Camaquã	22.74			23.92			22.10			22.07			-0.49	±1.26	0.16	0.28	-0.66	1.57
17Ct-13432-189 Pi 1/2/33	23.07			23.85			24.6			25.9			-0.97	±0.30	-0.79	5.19	-0.18	1.14
18Arroz vermelho Dom Pedrito	23.06			23.85			25.68			25.79			-0.82	±0.29	0.59	0.76	-1.41	2.66
19Arroz vermelho Torres	23.09			24.84			21.30			21.54			-1.70	±0.12	-0.22	0.09	-1.48	2.79
20Arroz vermelho Restinga Seca	21.01			22.97			20.51			18.88			-2.07	±0.35	1.88	0.33	-3.95	15.40
21Arroz vermelho B.do Colégio	20.57	20.79	0.31	22.74	22.86	0.16	20.54	20.53	0.02	18.41	18.65	0.33	-1.34	0.27	0.78	0.27	-2.12	4.33

a. $\Delta Ct = \mu$ de Tos17 - μ de Ferritina , b. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct T6 - \Delta Ct T0$, c. Incremento do número de cópias de Tos17 relativo ao calibrador $2^{-\Delta\Delta Ct} \cdot s^*$ (desvio standard)

$$= \sqrt{s_{Tos17}^2 + s_{Ferritina}^2} \text{ (Applied Biosystems, 1997).}$$

Para verificar se os produtos amplificados após a PCR em tempo real eram os esperados, procedeu-se a separação dos fragmentos em gel de agarose 2 %. Foi obtido um fragmento de 116 pb correspondente a *Tos17* e outro de 227 pb correspondente a ferritina (Figura 12). Esses resultados indicam que os fragmentos quantificados na PCR em tempo real possuem os tamanhos esperados.

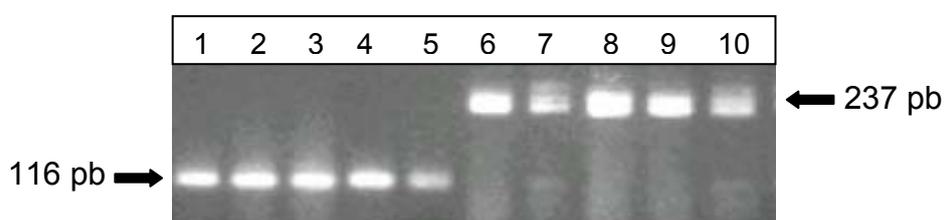


FIGURA 12. Perfil eletroforético do produto da amplificação por PCR de *Tos17* e de ferritina. Os fragmentos de *Tos17* (1-5) e ferritina (6-10) foram separados por eletroforese em gel de agarose - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

Para verificar se as diferenças observadas na Tabela 4 eram significativas, foram realizadas análises estatísticas. Os dados obtidos através do teste ANOVA revelaram que existem diferenças significativas no número de cópias do retrotransposon *Tos17*, após 6 meses de cultura *in vitro* entre os genótipos testados ($P = 0,0001$). Uma vez obtido um resultado estatisticamente significativo foram analisadas as diferenças entre os genótipos pelo teste de comparação de médias de Tukey, observando-se que alguns genótipos diferem significativamente entre si ($P < 0,05$) (Tabela 5) em relação ao número de cópias de *Tos17*.

Este estudo mostrou que existe variabilidade no número de cópias de *Tos17* nos genótipos avaliados, quando submetidos a 6 meses de cultura *in*

in vitro. O genótipo CNAi 9935 com um incremento de 17 cópias, se diferenciou dos outros genótipos. Os genótipos arroz vermelho Restinga Seca com um incremento de 15 cópias, arroz vermelho Banhado do Colégio e CNAi 9930 com um incremento de 4 cópias não diferiram significativamente, devido provavelmente ao tamanho pequeno da amostra. Os outros 17 genótipos não apresentaram diferenças significativas (Tabela 5).

TABELA 5. Média do número de cópias do retrotransposon *Tos17* nos genótipos avaliados, após 6 meses de cultura *in vitro* - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

Genótipo	Média*	Genótipo	Média*
CNAi 9935	17.15 a	CNAi 9933	1.54 c
A. vermelho Restinga Seca	15.40 ab	CNAi 9937	1.58 c
A. vermelho B. do Colégio.	4.33 bc	CNAi 9932	1.46 c
CNAi 9930	3.75 bc	Ct-13432-189 Pi 1/2/33	1.14 c
A. vermelho Don Pedrito	2,66 c	CNAi 9934	0,96 c
A. vermelho Torres	2.79 c	Ct 13958-12-M-1-4-M-M-4 SR-M(BG 90-2/O. <i>rufipogon</i>) 6	1.00 c
CNAi 9936	2.35 c	Ct 13941-27-M-16-5-M-M-1 SR-M(BG 90-2/O. <i>rufipogon</i>) 1	0.99 c
IRGA 421	2.09 c	CNAi 9931	0.99 c
Ct 13941-27-M-16-6-M-M-1 SR-M (BG 90-2/O. <i>rufipogon</i>) 2	1.73 c	Ct 16049A-7-3-1-2-M-M-M (BG 90-2/O. <i>glaberrima</i>) 7	0.87 c
Ct 13956-29-M-25-4-M-M-1 SR-M(BG 90-2/O. <i>rufipogon</i>) 3	1.69 c	Ct 13958-12-M-1-4-M-M-3 SR-M(BG 90-2/O. <i>rufipogon</i>) 5	0.53 c
A. vermelho Camaquã	1.57 c		

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Hirochika (1993) observou que os retrotransposons *Tto1* e *Tto2* eram ativados pela cultura de tecido em fumo. Novamente Hirochika et al., 1996; Hirochika, 1997 e 2001 observou que calos embriogênicos de arroz que foram submetidos a diferentes tempos de cultura aumentaram seu número de cópias, indicando que os retrotransposons são ativados durante o cultivo *in vitro*. A ativação de retrotransposons por estresse ambientais é muito comum nos organismos eucariotos, incluindo as plantas. Esta ativação é regulada por mecanismos de controle da transcrição como seqüências *cis*, similares a genes de defesa das plantas (Grandbastien, 1998). Em contraste com outros retrotransposons de plantas, em condições normais de cultivo, o número de cópias de *Tos17* é baixo, de 1 a 5, dependendo do cultivar. O cultivar Nipponbare do grupo *japonica*, por exemplo, contém 2 cópias em seu genoma (Miyao et al., 2003).

O resultado do presente estudo confirma estas observações, indicando um aumento no número de cópias em alguns genótipos. Foram observadas diferenças na resposta nos genótipos CNAi 9935 e arroz vermelho Restinga Seca, embora todos tenham sido submetidos ao mesmo tempo de cultura. A variabilidade observada no número de cópias entre os diferentes genótipos pode ser atribuída a diferenças no estado de regulação da transcrição dos LTRs de *Tos17* nos genótipos (Hirochika et al., 1996, Liu et al., 2004). O modo de replicação dos retrotransposons via transcrição de um intermediário de RNA, pode rapidamente incrementar o número de cópias deles no genoma e gerar um aumento de tamanho do genoma das plantas (Kumar, 1996; San Miguel & Bennetzen, 1998). Em determinadas situações,

pode ocorrer a perda da capacidade de transcrição de suas cópias, devido a mecanismos de silenciamento epigenéticos que atuam antes da transcrição, como a metilação do DNA (Matzke & Matzke, 1998) ou inativação por recombinação desigual entre homólogos e recombinação ilegítima (Devos et al., 2002). Estudos futuros serão necessários para a obtenção de maiores informações a respeito do nível de transcrição de *Tos17* e os mecanismos que diferenciam sua expressão nos genótipos aqui estudados.

A ativação dos retrotransposons também é influenciada pela introdução de DNA de espécies silvestres, modificando o estado de metilação da base nitrogenada citosina dos LTRs dos retrotransposons originais, permitindo sua reativação transcricional, permitindo que possam mover-se novamente pelo genoma e gerar cópias deles mesmos (Liu & Wendel, 2000). Liu et al. (2004) e Han (2004) realizaram estudos com linhas de arroz que possuem DNA introduzido do genótipo *Zizania latifolia*. Foi observado que após a cultura de tecidos estas linhas apresentavam um número maior de cópias de *Tos17*, e que estas alterações hereditárias epigenéticas deviam-se à hiper ou hipo metilação das citosinas. Portanto, o estado de metilação do DNA possui um importante papel na defesa das plantas em resposta à atividade de elementos móveis.

No presente estudo, o genótipo CNAi 9935 descendente de um cruzamento com uma espécie silvestre apresentou um aumento no número de cópias. Entretanto, não foram observadas diferenças no número de cópias de *Tos17* nos outros genótipos provenientes de cruzamentos com espécies silvestres. Uma possível explicação, é que as análises das progênies

ocorreram em gerações filiais F7, F8 e F9. Possivelmente, em alguns casos a seleção artificial utilizada tenha priorizado as características do genótipo BG-90-2, e perdido conteúdo de DNA das espécies silvestres. Dessa forma, permaneceu no genoma a cópia original de *Tos17* com as citosinas metiladas, sem atividade de transcrição. Estudos futuros sobre o estado de metilação dos retrotransposons destes genótipos são necessários.

4.5. Análise das regiões que flanqueiam os insertos de *Tos17*

Foram avaliadas as 7 plantas obtidas após a regeneração (item 4.2), 4 plantas derivadas de calos de IRGA 421 e 3 plantas de Ct 16049A-7-3-1-2-M-M-M (BG 90-2/*O. glaberrima*) F8. O DNA extraído das mesmas, segundo item 3.5, foi primeiramente ligado aos adaptadores AD1 e amplificado com oligonucleotídios específicos para os adaptadores e os LTRs, em sentido direto e reverso. Observou-se um fragmento de 1000 pb, quando amplificado com oligonucleotídeos em sentido direto, e três fragmentos de tamanhos 900 pb, 1000 e 1600 pb com oligonucleotídeos em sentido reverso (Figura 13). Após as amplificações, foram seqüenciados os fragmentos obtidos em sentido direto, devido a melhor qualidade do fragmento amplificado. Foram seqüenciados sete fragmentos amplificados.

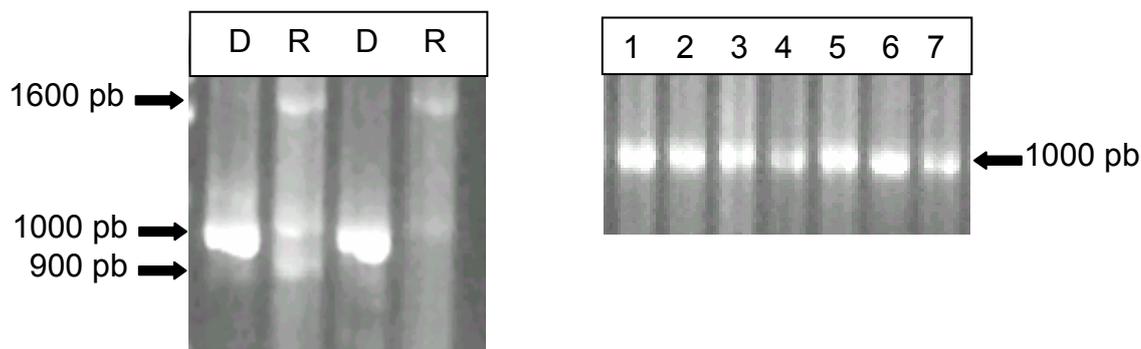


FIGURA 13. Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados por PCR a partir das seqüências flanqueadoras dos insertos *Tos17*. Em sentido direto (D), reverso (R), produtos obtidos das plantas regeneradas em sentido direto (1-7). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

As seqüências obtidas das ampliações dos fragmentos isolados correspondentes às regiões que flanqueiam o inserto de *Tos17*, foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank através do uso do programa Blastn (Altschul et al., 1990). Seis seqüências indicaram alta similaridade com clones contendo DNA dos cromossomos 2, 6 e 7 de *O. sativa* grupo *japonica* (Tabela 6).

Estas mesmas seqüências nucleotídicas quando comparadas com seqüências depositadas no GenBank através do uso do programa Blastx (Altschul et al., 1990), não mostraram similaridade com proteínas conhecidas. Uma provável explicação para este fato, pode ser que a seqüência e função do gene ainda não foi colocada no GenBank, que as inserções se localizaram em regiões não codificantes como íntrons, ou ainda em regiões de DNA altamente repetitivo como regiões centroméricas ou teloméricas. Estes resultados quando tomados em conjunto com a ausência de alterações fenotípicas das 6 plantas

(item 4.2), indicam que possivelmente os insertos estão localizados em regiões não codificantes.

TABELA 6. Análise comparativa dos clones seqüenciados - UFRGS/LFM, Porto Alegre, RS. 2005.

Planta	Seqüência	Acesso	Valor E
IRGA 421 (1)	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 2, seqüência completa	AP008208.1	1e-58
IRGA 421 (2)	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 2, seqüência completa, BAC clone:OJ1001_D02	AP004037.3	0.0
	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 6, seqüência completa	AP008212.1	6e-31
IRGA 421 (3)	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 2, seqüência completa	AP008208.1	0.037
	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 7, seqüência completa, BAC clone:OSJNBa0066H10	AP005516.5	0.037
IRGA 421 (4)	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 2, seqüência completa	AP008208.1	1e-11
Ct 16049A-7-3-1-2-M-M-M (BG 90-2/O. <i>glaberrima</i>) (1)	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 2, seqüência completa	AP008208.1	1e-08
Ct 16049A-7-3-1-2-M-M-M (BG 90-2/O. <i>glaberrima</i>) (2)	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 2, seqüência completa	AP008208.1	2e-72
	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 6, seqüência completa	AP008212.1	2e-05
	<i>Oryza sativa japonica</i> DNA genômico, cromossomo 6, PAC clone:P0642B07	AP003623.3	2e-05
Ct 16049A-7-3-1-2-M-M-M (BG 90-2/O. <i>glaberrima</i>) (3)	Não se encontrou homologia com seqüências de <i>Oryza sativa</i>		

Miyao et al. (2003) e Yamazaki et al. (2001) observaram que as inserções de *Tos17* eram três vezes mais prováveis de serem encontradas em regiões gênicas contendo éxons e íntrons do que em regiões intergênicas, preferencialmente se inserindo em genes que codificam para proteínas quinase e genes de resistência a doenças. Os retrotransposons contribuem

significativamente para a evolução dos genes e genomas, também servindo como ferramenta de análise funcional de genes, para localizar, identificar e determinar a função de genes. Por outro lado, os estudos realizados por Yamazaki et al. (2001) também demonstram que *Tos17* preferencialmente se introduz dentro de cópias de *Tos17* já presentes no genoma, correspondente a regiões não codificantes. Estes resultados corroboram aqueles obtidos no presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

1. O retrotransposon *Tos17* está presente em genótipos silvestres, cultivados e provenientes de cruzamentos com espécies silvestres.
2. A cultura *in vitro* gerou um incremento no número de cópias do retrotransposon *Tos17* em 8 genótipos avaliados. O genótipo CNAi 9935 (BG 90-2/*O. glumaepatula*) houve diferença estatisticamente significativa dos demais genótipos.
3. As ampliações das seqüências flanqueadoras dos insertos do retrotransposon *Tos17*, apresentaram alta similaridade com seqüências genômicas de arroz.
4. Nenhum inserto foi localizado em regiões codificantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, G.K. et al. Screening of the Rice Viviparous Mutants Generated by Endogenous Retrotransposon *Tos17* Insertion. Tagging of a Zeaxanthin Epoxidase Gene and a Novel *OsTATC* Gene. **Plant Physiology**, Lancaster, v.125, p.1248-1257, 2001.

AL-KHAYRI, J.M. et al. Callus induction and plant regeneration of U.S. rice genotypes as affected by medium constituents. **In vitro cellular and developmental biology**, Columbia, v.32, p.227-232, 1996.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v.25, p.3389-3402, 1997.

APPLIED BIOSYSTEM. **ABI PRISM 7700 Sequence Detection System**: P/N 4303859, December 11, 1997. São Paulo, 1997. (User Bulletin, 2).

APPELS, R.; FRANCKI, M.; CHIBBAR, R. Advances in cereal functional genomics. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v.3, p.1-24, 2003.

BENDER, E.; JOY IV, R.W.; THORPE, T.A. [¹⁴C]-Glucose metabolism during shoot bud development in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.28, p.1335-1338, 1987.

BENNETZEN, J.L. The contributions of retroelements to plant genome organisation, function and evolution. **Trends Microbiology**, Cambridge, v.4, p.347-353, 1996.

BENNETZEN, J.L.; MA, J.; DEVOS, K.M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.95, p.127-132, 2005.

BERED, F. **Indução de calos, embriogênese somática e regeneração de plantas *in vitro* de aveia (*Avena sativa* L.)**. 1994. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

BHASKARAN, S.; SMITH, R.H. Regeneration in cereal in cereal tissue culture: A review. **Crop Science**, Madison, v.30, p.1328-1336, 1990.

BINGHAM, P.M.; ZACHAR, Z. Retrotransposons and FB elements from *Drosophila melanogaster*. In DE BERG, M.M. HOWE (Ed) **Mobile DNA**. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol., 1989. p.485-502.

BLANCHARD, J.L.; SCHMIDT, G.W. Pervasive migration of organellar DNA to the nucleus in plants. **Journal of Molecular Biology**, London, v.41, p.397-406, 1995.

BRASILEIRO, A.C.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998.

CARDONE, S.; OLMOS, S.; ECHENIQUE, V. Métodos para generar variabilidad. In: ECHENIQUE, R.C; MROGINSKI, L. **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal**. Buenos Aires: INTA, 2004. p.81-96.

CHANDRARATNA M.F. **Genetics and Breeding of Rice**. London: Longmans, 1964. 389 p.

CHU, C.C. et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Sciencia Sinica**, Peking, v.18, n.5, p.659-668, 1975.

COFFIN, R.; TAPER, C.D.; CHONG, C. Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.54, p.547-551, 1976.

COMISSÃO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E COOPERATIVISMO. **Série Culturas: Arroz**. Porto Alegre, 2002.

COSTA, J. Reacción em cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v.22, n.5, p.299-305. 2004.

DEVOS, K.M.; BROWN, J.K.M., BENNETZEN, J.L. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.12, p.1015-1079, 2002.

DODE, L.B. **Genetic modification of rice (*Oryza sativa* L.) starch biosynthesis**. 1999. 101 f. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em biotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

DOOLITTLE, W.F.; SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, London, v.284, p.601-603, 1980.

EDELMAN, J.; HANSON, A.D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus culture. **Planta**, Berlin, v.98, p.150-156, 1971.

ENOKI, H. et al. Ac as a tool for the functional genomics of rice. **The Plant Journal**, Oxford, v.19, n.5, p.605-613, 1999.

FAGUNDES, P.R.R. **Implicações da seleção recorrente para caracteres adaptativos de uma população de arroz irrigado**. 2004. 91 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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

FESCHOTTE, C.; JIANG, N.; WESSLER, S.R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. **Nature Reviews Genetics**, London, v.3, p.329-341, 2002.

FLAVELL, R.B. et al. Genome size and proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. **Biochemical Genetics**, New York, v.12, p.257-269, 1974.

FRIDBORG, G. Growth and organogenesis in tissue culture of *Allium cepa* var. Proliferum. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.25, p.436-440, 1971.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.402, p.1445-1454, 2004.

GATHERCOLE, R.W.E.; MANSFIELD, K.J.; STREET, H.E. Carbon dioxide as an essential requirement for cultured sycamore cells. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.37, p.213-217, 1976.

GE, X. et al. A tissue culture system for different germplasms of *indica* rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, p. 1-11, 2006, *in press*.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, San Diego, v.25, p.386-401, 2001.

GOFF, S.A. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, Washington, v.296, p.92-100, 2002.

GOLDBERG, R.B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science**, Washington, v.266, 605-614, 1994.

GRANDBASTIEN, M.A.; LUCAS, H.; MOREI, J.B. The expression of the tobacco *Tnt1* retrotransposons is linked to the plant defense responses. **Genetica**, Dordrecht, v.100, p.241-252, 1997.

GRANDBASTIEN, M.A. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. **Trends in Plant Science**, Kidlington, Oxford, v.3, n.5, p.181-187, 1998.

GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP : EMBRAPA. CNPH, 1990. p.89-164.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas II**. Brasília: Embrapa-SPI : Embrapa.CNPH, 1999. p.533-568.

GURA T. Reaping the plant gene harvest. **Science**, Washington, v.287, n.5452, p.412–414, 2000.

HAN, F.P. et al. Mobilized retrotransposon *Tos17* of rice by alien DNA introgression transposes into genes and causes structural and methylation alterations of a flanking genomic region. **Hereditas**, Lund, v.141, p.243-251, 2004.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese “in vitro”. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília : EMBRAPA. CNPH. 1990. p.203-212.

HAVECKER, E.R.; XIANG, G.; VOYTAS, D.F. The diversity of LTR retrotransposons. **Genome Biology**, London, v.5, n.6, p.225.1-225.6, 2004.

HIROCHIKA, H. Activation of tobacco retrotransposons during tissue-culture. **EMBO Journal**, Oxford, v.12, p.2521-2528, 1993.

HIROCHIKA, H. et al. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.93, p.7783-7788, 1996.

HIROCHIKA H. Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. **Plant Molecular Biology**, Boston, v.35, n.231, p.231-240, 1997.

HIROCHIKA, H. Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.4, p.118-122, 2001.

HIROCHIKA, H. et al. Rice mutant resources for gene discovery. **Plant Molecular Biology**, Boston, v.54, p.325–334, 2004.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and immunity**, Hampshire, v.6, p.279-284. 2005.

IRALA, P.B. **Transformação genética de *Oryza sativa* Subespécies *indica* cultivar BR-IRGA 409**. 2002. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2002.

JAN, A. et al. Tissue culture response of local varieties of rice (*Oryza sativa* L.) of NWFP. **Journal of Biological Sciences**, Bombay, v.5, n.1, p.387-390, Índia, 2001.

JEON, J.S.; AN, G. Gene tagging in rice: a high throughput system for functional genomics. **Plant Science**, Shannon, v.161, p.211-219, 2001.

JIANG, N. et al. An active DNA transposon family in rice. **Nature**, London, v.421, p.163-167, 2003.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas II**. Brasília: Embrapa-SPI : Embrapa.CNPH, 1999. p. 519-532.

KHUSH, G.S.; BRAR, D.S. Rice genetics from Mendel to functional genomics. In: INTERNATIONAL RICE GENETICS SYMPOSIUM, 4., Los Baños, Philippines, 2000. **Proceedings** : Rice Genetics IV. New Delhi (India): Science Publishers: IRRI – International Rice Research Institute, 2000. 488p.

KHUSH, G.S.; BRAR, D.S.; HARDY, B. **Rice Genetics IV**. Los Baños : International Rice Research Institute, 2001.

KUMAR, A. The adventures of the Ty1- *copia* group of retrotransposons in plants. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.12, p.41-43, 1996.

KUMAR, A. et al. The Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants: organization, evolution, and use as molecular markers. **Genetica**, s'-Gravenhage., v.100, p.205-217, 1997.

KUMAR, A.; BENNETZEN, J.L. Plant Retrotransposons. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.33. p.479-532. 1999.

KUMAR, A.; HIROCHIKA, H. Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.6, n.3, p.127-134, 2001.

KUNZE, R.; SAEDLER, H.; LONNIG, W.E. Plants transposable elements. **Advances in botanical research**, London, v.27, p.331-470, 1997.

LEETON, P.R.; SMYTH, D.R. An abundant LINE-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.237, p.97-104, 1993.

LEWIN, B. **Genes VII**. 7th ed. Oxford: Oxford University press, 2000. 990p.

LIN, Y.J.; ZHANG, Q. Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.23, p.540-547, 2005.

LIU, B.; WENDEL, J.F. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. **Genome**, Ottawa, v.43, p.874-880, 2000.

LIU, Z.L. et al. Activation of a rice endogenous retrotransposon *Tos17* in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.109, p.200-209, 2004.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, San Diego, v.25, p.402-408, 2001.

LOPES, M.C.B. **Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de arroz irrigado**. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

LU, B.R. **Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae)**: historical perspective and current status. Los Baños : International Rice Research Institute, 1999. p.4-8. (Notes, 24)

MA, J.; DEVOS, K.M.; BENNETZEN, J.L. Analyses of LTR-Retrotransposon Structures Reveal Recent and Rapid Genomic DNA Loss in Rice. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.14, p.860-869, 2004.

MACKILL, D.J. et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, Ottawa, v.39, p.969-977, 1996.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. Princípios de Biotecnologia em Plantas. **Sociedade Brasileira de genética**, Riberão Preto, p.333, 1985.

MATSUO, T. et al (Eds.) **Science of the Rice Plant**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v.3: Genetics.

MATZKE, M.A.; MATZKE, J.M. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v.54, p.94-103, 1998.

McCLINTOCK, B. Controlling Elements and the Gene. **Department of Genetics, Carnegie Institution of Washington**, New York, p.197-216, 1956.

MELHORAMENTO de arroz. In: REUNIÃO SOBRE MEJORAMIENTO DE ARROZ EN EL CONO SUR, Goiania (GO), Brasil, 1989. [Informações]. [Goiania], 1989.

MIYAO, A. et al. Target Site Specificity of the *Tos17* Retrotransposon Shows a Preference for Insertion within Genes and against Insertion in Retrotransposon-Rich Regions of the Genome. **The Plant Cell**, Rockville, v.15, p.1771-1780, 2003.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Plant Physiology**, Lancaster, v.15, p.473-493, 1962.

NABORS, M.W.; KROSKEY, C.S.; McHUGH, D.M. Green spots are predictors of high callus growth roots and shoot formation in normal and salt stressed tissue cultures of oat (*Avena sativa* L.). **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.105, p.341-349. 1982.

NORSTOG, K. Induction of embryo-like structures by kinetin in cultured barley embryos. **Development Biology**, New York, v.23, p.665-670. 1970.

OCHMAN, H; GERBER, A.S.; HARTL, D.L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. **Genetics**, Austin, v.120, p.621-623, 1988.

OKA, H.I.; MORISHIMA, H. Wild progenitors of cultivated rice. In: SCIENCE of the rice plant genetics. Tokyo: [s.n.], 1997. v.3, p. 88-111.

ORGEL, L.E.; CRICK, F.H.C. Selfish DNA: the ultimate parasite. **Nature**, London, v.284, p.604-607, 1980.

PASSAGLIA, L.M.P. Elementos genéticos móveis. In: FREITAS, L. B.; BERED F (Org.) **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p.206-207.

POUTEAU, S.; GRANDBASTIEN, M.A.; BOCCARA M. Microbial elicitors of plant defense response activate transcription of a retrotransposon. **The Plant Journal**, Oxford, v.5, p.535-542, 1994.

RANGEL, P.H.N.; GUIMARÃES, E.P.; NEVES, P.C.F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado de Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, p.349-357, 1996.

RANGEL, P.H.N.; ZIMMERMANN, F.J.P. Ganhos de produtividade de grãos no melhoramento populacional do arroz de várzea. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ, 6., 1998, Goiânia. **[Anais]** Perspectivas para a cultura do arroz nos ecossistemas de várzeas e terras altas. Goiânia: EMBRAPA.CNPAP, 1998. p. 174-176. (Documentos, 85).

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus karoten. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.45, p.344-345. 1958.

RENSINK, W.A.; BUELL, C.R. Arabidopsis to Rice. Applying Knowledge from a Weed to Enhance Our Understanding of a Crop Species. **Plant Physiology**, Lancaster, v.135, p. 622–629, 2004.

RIKER, A.J; HILDEBRANDT, A.C. The carbon and nitrogen nutrition of gall tissue in culture. **Annals of Biology**, Ludhiana, v.30, p.283-296, 1954.

SAHRAWAT, A; CHAND, S. Effects of L-tryptophan, L-proline, and activated charcoal on plant regeneration in *indica* rice (*Oryza sativa* L.). **International Rice Research Institute**, Los Baños, v.23, n.3, p.10-12, 1998.

SAN MIGUEL, P. et al. Nested retrotransposons in the intergenic of the maize genome. **Science**, Washington, v.274, p.765-768, 1996.

SAN MIGUEL, P.; BENNETZEN, J.L. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the masive amplification of intergene retrotransposons. **Annals of Botany**, Oxford, v.81, p.37-44, 1998.

SANT'ANA, E.P.; BARROS FREIRE, A.; DIAS, M.D. Variação somaclonal em algumas características do grão e do ciclo da planta de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência agrotecnológica**, Lavras, v.25, n.2, p.336-345, mar./abr., 2001.

SASAKI, T. et al. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. **Nature**, London, v. 420, p.312-316, 2002.

SATO, Y. Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene *OSH15* affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants. **EMBO Journal**, Oxford, v.18, p.992-1002, 1999.

SCHNERR, H.; NIESSEN, L.; VOGEL, R.F. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler-PCR using SYBR[®]Green I for continuous fluorescence monitoring. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.71, p.53-61, 2001.

SHOEB, F. et al. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: Improvement of regeneration by modulation of modulation of polyamine metabolism in different genotypes of *indica* rice. **Plant Science**, Shannon, v.160: p.1229-1235, 2001.

- STREET, H.E. The nutrition and metabolism of plant tissue and organ culture. In: WILMAR, E.N., ed. **Cells and tissue in cultures**: methods, biology and physiology. New York: Academic Press, 1966. v.3, p.533-629.
- TERZI, M.; LOSCHIAVO, F. In: BHOJWANI, S.S. Plant tissue culture: applications and limitations. **Development in Crop Science**, Delhi, v.19, p.460,1990.
- TYAGI, A.K.; MOHANTY, A. Rice transformation for crop improvement and functional genomics. **Plant Science**, Shannon, v.158, p.1–18, 2000.
- TYAGI, A.K. et al. Structural and functional analysis of rice genome. **Journal of Genetics**, London, v.83, n.1, p.79-99, 2004.
- VALDEZ, M. et al. Plant regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars from mature embryo-derived calli. **Revista de Biología Tropical**, San José, 44(3)/45(1): 13-21, 1996-1997.
- VOYTAS, D.F. et al. The structure, distribution and evolution of the *Ta1* retrotransposable element family of *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, Austin, v.126, p.713-721, 1990.
- XIONG, Y.; EICKBUSH, T.H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. **EMBO Journal**, Oxford, v.9, 3353–3362,1990.
- YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v.19, p.691-699, 1978.
- YAMAZAKI, M. et al. The rice retrotransposon *Tos17* prefers low-copy-number sequences as integration targets. **Molecular Genetics Genomics**, Berlin, v.265, p.336-344, 2001.
- YAZAKI, J. et al. The Rice PIPELINE: a unification tool for plant functional genomics. **Nucleic Acids Research**, London, v.32, p.383-387, 2004.
- YEUNG, E.C. Structural and developmental patters in somatic embryogenesis. In: THORP, T.A. (ed). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht : [s.n.], 1995. p.205-247.
- YU, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, Washington, v.296, p.79-92, 2002.

6. VITA

Flavia Vanina Ferreira, filha de Florentina Carmen Farina e Aníbal Ferreira. Nasceu em Rios Gallegos, Estado de Santa Cruz (Argentina) em 25 de outubro de 1971.

Cursou o ensino fundamental no Colégio N° 1 Domingo Sarmiento, em Posadas, Misiones (Arg.). O ensino médio, no Colégio de Comercio N° 6 Mariano Moreno, em Posadas, Misiones (Arg.). Em 1989 ingressou no Curso de Licenciatura em Genética da Universidade Nacional do Estado de Misiones, em Posadas, onde graduou-se como Licenciada em Genética em 2002. Em 2004 ingressou no curso de Mestrado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Entre agosto do 2001 e abril de 2002, realizou o trabalho de conclusão de graduação no laboratório de Biofísica da UFRGS, baixo a orientação do Professor Tarso Ledur Kist, na área de bioinformática. Em setembro do 2003 ingressou como estagiária no Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFRGS.