



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTUDOS DE VARIABILIDADE  
GENÉTICA EM MUTANTES DE ARROZ QUANTO À TOLERÂNCIA À  
TOXIDEZ POR FERRO**

**LÍVIA SCHEUNEMANN DOS SANTOS**

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO



**Universidade Federal de Pelotas**  
Campus Universitário s/nº  
Caixa-postal 354 CEP 96010-900  
Pelotas – RS – Brasil

2006

**Livia Scheunemann dos Santos**

**Caracterização morfológica e estudos de variabilidade genética em  
mutantes de arroz quanto à tolerância à toxidez por ferro**

Monografia apresentada  
como um dos requisitos ao  
grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas, área de  
concentração Biotecnologia,  
do Curso de Ciências  
Biológicas do Instituto de  
Biologia da Universidade  
Federal de Pelotas,  
Pelotas/RS.

**ORIENTADOR:**

**PROF. PH.D ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA**  
ENGº AGRÓNOMO. PH.D EM GENÉTICA  
PROF DPTO FITOTECNIA-FAEM/UFPEL

**Pelotas**

Estado do Rio Grande do Sul – Brasil  
19 de abril de 2006

"Felizmente a ciência, assim como a natureza à qual pertence, não é limitada pelo tempo nem pelo espaço. Pertence ao mundo, é de nenhum país e de nenhuma idade. Quanto mais sabemos, mais sentimos nossa ignorância, mais sentimos o quanto resta desconhecido; e teoricamente, o sentimento do herói Macedônio nunca pode ser aplicado - sempre há novos mundos a conquistar."

Sir Humphry Davy

## AGRADECIMENTOS

Às mulheres de minha vida: minha mãe Ana Lore Scheunemann, minha madrinha Ingelore Scheunemann de Souza e minha avó Eny Neutzling Scheunemann pelo amor, carinho, compreensão, dedicação e por tudo que me ensinaram em minha vida.

Ao meu amor, amigo e companheiro Rafael Góz Soares pelo amor, carinho e paciência nessa parte da jornada e em tudo que ainda está por vir.

À minha família, que sempre me acompanha.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas.

Ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento pela oportunidade concedida de realizar meus estudos.

Ao Professor Antônio Costa de Oliveira pela sua orientação, dedicação, confiança depositada e amizade.

Ao Professor Fernando Irajá Félix de Carvalho pelos ensinamentos transmitidos e amizade.

À Doutoranda Emilia Malone, minha co-orientadora, professora e grande amiga pela paciência, ensinamentos e risadas.

Às colegas de laboratório Albina, Juliana, Adriana e Claudete pela amizade criada, companheirismo no trabalho, confiança depositada e conversas reconfortantes.

Aos amigos Cíntia Pereira Barenho, Helena Goebel Brey, Luis Frederico Tavares Krause e André Vinícius dos Santos pela amizade, carinho e ajuda nas horas difíceis.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Os recursos utilizados para a realização deste trabalho foram provenientes do Projeto CNPq: Melhoria de Gramíneas por mapeamento comparativo e FINEP: *Estratégias de Prospecção de genes em gramíneas com importância agrônômica*.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>11</b>
ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DO ARROZ (ORYZA SATIVA L.)	11
IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DA ESPÉCIE	12
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FERRO	13
<i>Ferro no solo</i>	13
<i>Ferro na planta</i>	14
<i>Ferro na solução nutritiva</i>	15
<i>Absorção de ferro</i>	15
<i>Características da toxidez por ferro</i>	16
OBJETIVOS DO FITOMELHORAMENTO NA CULTURA DE ARROZ	18
MUTAÇÕES	20
<i>Agentes Mutagênicos</i>	21
<i>Utilidades de cultivares tolerantes</i>	22
MARCADORES MOLECULARES	23
<i>AFLP (Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados)</i>	25
<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
GERAL	26
ESPECÍFICO	26
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
OBTENÇÃO DE GENÓTIPOS MUTANTES	27
HIDROPONIA	28
BIOLOGIA MOLECULAR	30
<i>Material Vegetal</i>	30
<i>Análise de AFLP</i>	30
<i>Cálculo da frequência alélica</i>	32
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
HIDROPONIA	33
BIOLOGIA MOLECULAR	42
<i>Análise de frequência alélica dos marcadores moleculares</i>	44
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>45</b>
HIDROPONIA	45
BIOLOGIA MOLECULAR	46
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>47</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação dos genótipos utilizados para análise.....	27
Tabela 2.	Relação das 9 Combinações de <i>primers</i> utilizadas na análise de AFLP.....	31
Tabela 3.	Resumo da análise de variância.	33
Tabela 4.	Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à testemunha tolerante EPAGRI 108 na dose de 0 mM de ferro.....	34
Tabela 5.	Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à testemunha sensível IRGA 409 na dose de 0 mM de ferro.....	35
Tabela 6.	Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à testemunha TAIM na dose de 0 mM de ferro.....	37
Tabela 7.	Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à cultivar EPAGRI 108 na dose de 9 mM de ferro.....	38
Tabela 8.	Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à cultivar IRGA 409 na dose de 9 mM de ferro.....	39
Tabela 9.	Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro e cálculo do Desempenho Relativo (dr%) das famílias em relação à cultivar TAIM na dose de 9 mM de ferro.....	41
Tabela 10.	Relação das 9 Combinações de <i>primers</i> utilizadas na análise de AFLP e número de bandas polimórficas obtidas.....	42

## RESUMO

A toxidez por ferro é considerada um dos mais importantes problemas de toxicidade de metais e que com mais freqüência limita a produção da cultura de arroz (*Oryza sativa* L.), seja no plantio sob condição de sequeiro ou sob irrigação por inundação. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfológica e molecularmente famílias mutantes de arroz derivadas da cultivar BRS7 TAIM irradiadas com raios gama na dose de 250 Gy. Para a análise morfológica foram avaliados 38 genótipos em concentrações de 0 e 9 mM de ferro por meio da cultura hidropônica, avaliando as seguintes variáveis: número de raízes (NR), comprimento da raiz principal (CRP), comprimento do coleóptilo (CC), inserção da primeira folha (IPF), comprimento da primeira folha (CPF), comprimento da segunda folha (CSF) e comprimento da parte aérea (CPA). Após as análises estatísticas correspondentes, constatou-se que a variável que melhor discriminou as famílias estudadas foi o IPF e as famílias CGF-Z-M05-188, CGF-Z-M05-243, CGF-Z-M05-42 e CGF-Z-M05-192 foram destaques em diferentes avaliações apresentando bom desempenho no estresse estudado. O desenvolvimento de novas cultivares é um processo contínuo dentro das instituições de pesquisa agrícola e, contudo, leva-se muito tempo para desenvolver uma nova cultivar através de técnicas convencionais. Portanto, a obtenção de variabilidade mediante o emprego de agentes mutagênicos tem sido amplamente empregada no melhoramento vegetal em função da capacidade de alterar uma ou mais características desejáveis. Foi então realizada uma análise molecular do tipo AFLP para estudos de dissimilaridade entre as famílias mutantes como produto do efeito da mutação sobre elas. Observou-se que a mutação aumentou a variabilidade entre as sementes irradiadas. Na análise de agrupamento baseado em dados moleculares, as famílias CGF-Z-M05-280 e CGF-Z-M05-260 P se apresentaram como as mais próximas com uma distância de 0,448. Na análise de freqüência alélica, 13 famílias apresentaram marcador de cópia única, seguramente produto da alteração causada pela mutação. Tais resultados sugerem que sejam realizados mais estudos em laboratório sobre estes marcadores de cópia única a fim de corroborar sua relação e importância com o estudo realizado.

## ABSTRACT

Iron toxicity is considered one of the most important metal toxicity problems and that which most frequently limits rice (*Oryza sativa* L.) production, either under dry condition or under flooding by irrigation. This work had as objective characterize morphologic and molecularly mutant rice families derived from BRS7 TAIM irradiated with gamma ray in the dose of 250 Gy. for the morphologic analysis 38 genotypes where evaluated in concentrations of 0 and 9 mM of iron in hidroponic culture, evaluating the variables: number of roots (NR), main root length (MRL), coleoptile length (CL), first leaf insertion (FLI), first leaf length (FLL), second leaf length (SLL) and aerial part length (APL). After the correspondent statistical analysis it was evidenced that the variable that better discriminated the studied families was FLI and the families CGF-Z-M05-188, CGF-Z-M05-243, CGF-Z-M05-42 and CGF-Z-M05-192 were evidenced in different evaluations showing a good performance for the studied stress. Development of new cultivars is a continuous process in agriculturist research institutions and it takes a long time to develop a new cultivar trough conventional techniques. Therefore, the accomplishment of variability through use of mutagenic agents has been widely applied for its ability to alter one or more desirable characteristics. Hence an AFLP analysis was made for dissimilarity studies among the mutant families as a product of the mutation effect on them. After the assay it was observed that the mutation increased the variability among the irradiated seeds. The families CGF-Z-M05-280 and CGF-Z-M05-260 P presented themselves as the closest ones with a 0,448 distance. In the allele frequency analysis, 13 families exhibited a single copy marker, surely a product of the alteration caused by the mutation. These results suggest that more laboratory studies should be realized on these single copy markers to confirm their relation and importance with the present study.

## INTRODUÇÃO

Gramínea anual da família Poacea, *Oryza sativa* L. é uma planta herbácea que possui um único embrião e um só cotilédone, sendo assim compreendida no grupo das monocotiledôneas. Sendo um dos cereais mais cultivados no mundo, constitui-se em alimento básico para 2/3 da população mundial, tendo ainda ampla distribuição geográfica (Souza, 1991). O Maior produtor da América Latina, Brasil, é responsável por aproximadamente 88% da produção do Mercosul. O Rio Grande do Sul é o principal produtor de arroz irrigado no Brasil (IBGE, 2003).

O arroz apresenta um genoma pequeno (390 Mpb) e tem sido extensamente manipulado geneticamente, sendo visualizado como modelo de pesquisa para outras culturas (Devos & Gale, 2000). Isto permite que seja utilizado para a realização de estudos de colinearidade molecular em outras espécies de gramíneas, e assim, com base na sintenia, identificar e caracterizar genes de interesse em espécies relacionadas.

A nutrição mineral é um dos fatores mais importantes envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal e, portanto, na sua produção. Entre os elementos minerais essenciais, o Ferro é de grande importância devido à sua implicação em processos fundamentais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio e síntese de DNA e às suas propriedades físico-químicas; participando em grande parte das reações redutivas básicas tanto na produção e consumo de oxigênio (Briat, 1995; Briat, 1997). Além disso, age como um co-fator de enzimas essenciais envolvidas na síntese de fitormônios (enzimas formadoras de etileno, por exemplo) (Bouzayen, 1991; Siedow, 1991).

As plantas enfrentam grandes diferenças na disponibilidade de ferro no ambiente devido à sua imobilidade, e tanto deficiência quanto excesso deste elemento pode ser responsável por disfunções nutricionais severas afetando profundamente sua fisiologia (Ponnamperuma, 1955). A desordem nutricional associada à toxidez de ferro tem sido atribuída ou à excessiva absorção do elemento pela planta, caso em que é chamada “toxidez direta”, ou à deficiência generalizada de outros nutrientes, induzida por altos teores de  $\text{Fe}^+$  solúvel no meio de cultivo, sendo então chamada de “toxidez indireta” (Vahl, 1991). Dentre os sintomas morfológicos do excesso de Ferro, o melhor caracterizado é o bronzeamento (*bronzing*) em arroz (Bienfait, 1985), caracterizado por numerosas manchas pequenas (pontos), de coloração castanha escura, que iniciam nas pontas das folhas mais velhas e se estendem posteriormente para a base da folha (Mengel, 1982).

É possível também que, na deficiência de ferro, hormônios atuem na resposta à situação de stress. Uma vez que a presença de ferro intracelular pode catalisar a geração de intermediários de oxigênio reativo, a ferritina – com sua capacidade de estoque de ferro pode ter papel importante na proteção das células ao stress oxidativo (Balla, 1992).

A indução à peroxidase é uma resposta comum de plantas superiores a quantidades tóxicas de metais, sendo a toxicidade de ferro uma disfunção nutricional do arroz associada a solos inundados (Ponnamperuma, 1955), enquanto encontra-se que a aplicação de ferro em excesso induz a atividade de peroxidase em folhas de arroz (Peng, 1993; Peng, 1996; Fang, 2000).

A toxidez pela forma férrica ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pode causar perdas consideráveis na produção de arroz, especialmente em solos ácidos em áreas tropicais e subtropicais (Fageria, 1997; Wu, 1998), como o encontrado no sul do Brasil, que caracteriza-se por ser rico em ferro e possuir baixo pH (Silva, 2003).

A existência de diferenças entre genótipos de uma mesma espécie quanto à capacidade de absorção de nutrientes, resistência a elementos tóxicos no meio nutritivo e eficiência de utilização dos nutrientes absorvidos no processo de produção das plantas é um fato comprovado em várias espécies de plantas cultivadas (Clark, 1983; Furlani, 1986). No caso do arroz, como o distúrbio não ocorre em todos os cultivares, é de se esperar que as causas estejam relacionadas a fatores fisiológicos e/ou morfológicos, que diferem entre cultivares. Baseados em

tal variabilidade, os melhoristas incluíram a resistência à toxidez por ferro no rol de características sistematicamente avaliadas nas cultivares em processo de melhoramento (Vahl, 1991). A identificação de genótipos tolerantes e suscetíveis à toxidez por ferro tornará possível a realização de estudos genéticos através da aplicação de técnicas de marcadores moleculares. O maior interesse na aplicação dos marcadores genéticos no melhoramento vegetal é a esperança de estabelecer ligações entre os marcadores e os genes que controlam determinada característica (Koebner et al, 1994). Conseguindo assim a incorporação dos genes responsáveis pela tolerância em cultivares de alta produtividade, podendo contribuir para o incremento da área cultivada e conseqüentemente aumentar a produtividade do cereal, reduzindo os impactos ambientais do cultivo convencional e diminuir o custo de produção. Para isto, deve-se dispor de variabilidade fenotípica; a baixa freqüência de mutações espontâneas pode levar a uma reduzida ou inexistente variabilidade genética desejada em programas de melhoramento. Isto pode dificultar ou inviabilizar avanços na seleção (Sigurbjornsson, 1977). O uso de mutações induzidas foi apontado como um caminho muito atrativo para adicionar caracteres desejáveis em um sistema gênico balanceado (Mac Key & Qualset, 1986). O agente mutagênico atua aumentando a probabilidade de ocorrência de uma mutação, sendo portanto utilizado com a finalidade de se obter constituições genéticas alternativas à de origem para futuras avaliações tanto morfológicas quanto moleculares.

O presente trabalho visa analisar e caracterizar famílias mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) com o objetivo de aprofundar os conhecimentos relativos à tolerância dos genótipos à toxidez por ferro e outros caracteres de importância agronômica.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Origem e classificação botânica do arroz (*Oryza sativa* L.)

O arroz, *Oryza sativa* L., é uma planta anual, da família das gramíneas, da qual se conhecem diferentes variedades cultivadas. O seu sistema radicular é formado por raízes seminais e adventícias que constituem a característica raiz fasciculada conhecida. O caule é colmo, com nós bem marcados correspondentes a tabiques internos e entrenós revestidos pelas bainhas das folhas que os envolvem. Estas apresentam-se em número variável e possuem normalmente bainha, lígula e limbo, variando a sua coloração do verde-claro ao verde-escuro. Algumas variedades podem apresentar as folhas mais ou menos coradas de violáceo. A inflorescência do arroz é uma panícula de espiguetas unifloras, em geral solitárias, em cada nó das ramificações da panícula ou, por vezes, agrupadas. As espiguetas estão inseridas em pedicelos, últimas ramificações da panícula, que apresentam um comprimento muito variável dentro da mesma panícula e de variedade para variedade. Possuem uma única flor envolvida por duas glumelas, tendo na base duas lodículas, seis estames, um ovário com estilete curto e dois estigmas plumosos (Silva, 1975).

A duração do ciclo vegetativo do arroz, isto é, o número de dias que decorre desde a sementeira até a maturação, é muito variável segundo a variedade considerada e as condições de solo e de clima, podendo, no entanto fixar-se entre

80 a 220 dias para as variedades da subespécie *indica* e de 120 a 180 dias para as da subespécie *japonica* (Silva, 1975).

Sobre a origem desse cereal, sabe-se ainda muito pouco (Maclean *et al.*, 2002). Contudo, admite-se que o centro de origem do arroz se situa na zona pré-himalaia do sudoeste asiático e que, a partir da Índia, a cultura se tenha expandido até a China numa época ainda não bem determinada, mas que se supõe ter sido a 3000 anos antes da nossa era (Silva, 1975). A distribuição bastante abrangente dos parentes silvestres do arroz na África, no Sul e Sudeste da Ásia e nas Américas do Sul e Central sugere a existência de um genitor comum nas úmidas regiões do supercontinente Gondwana, antes da deriva dos continentes (Chang, 1974).

O número básico de cromossomos do arroz *Oryza sativa* L. é 12 ( $2n = 24$ ), porém existem espécies poliplóides com  $2n = 48$  (Morishima *et al.*, 1992).

### **Importância socioeconômica da espécie**

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, sendo cultivado em aproximadamente 150 milhões de hectares, com uma produção mundial de arroz estimada para 398,3 milhões de toneladas (polido) em 2004/05, cerca de 2% a mais do que o ano anterior, mas ainda 3% abaixo da produção recorde de 408,7 milhões de toneladas em 1999/2000 (USDA, 2004).

A Ásia destaca-se como a primeira produtora mundial de arroz e o Brasil coloca-se em oitavo colocado na produção mundial, com cerca de 10,6 toneladas (Castelo Branco, 2005). Somente o Rio Grande do Sul, maior produtor nacional de arroz irrigado, contribui com mais de 40% da produção nacional, sendo a maioria das cultivares utilizadas pertencentes a subespécie *indica* (Azambuja, 1996).

## **Propriedades físico-químicas do ferro**

A nutrição mineral refere-se ao suprimento, à absorção e à utilização de nutrientes essenciais pela planta. A produtividade das culturas é influenciada por vários fatores e a disponibilidade de nutrientes, na quantidade e proporção adequadas, constitui um dos principais. A otimização da eficiência nutricional é fundamental para aumentar a produtividade e reduzir o custo de reprodução. Vários fatores, como clima, solo, planta e suas interações afetam a absorção e a utilização de nutrientes pelas plantas. Para a eficiência máxima de nutrientes, todos estes fatores devem ter nível ótimo durante o desenvolvimento da cultura (Vieira, 1999).

Para o desenvolvimento normal das plantas, é necessário o transporte contínuo de nutrientes do sistema solo para o sistema planta. Os nutrientes se caracterizam em macro e micronutrientes, dependendo da exigência nutricional da planta para cada elemento (Vieira, 1999).

Os micronutrientes participam principalmente em processos enzimáticos da planta, sendo exigidos, portanto, em menor quantidade, sendo que elemento ferro tem como principal função ativar enzimas e transportadores de elétrons (Taiz, 2004), participando em processos fundamentais como fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, síntese de DNA e em grande parte das reações, tanto na produção como consumo de oxigênio (Briat, 1995; Briat, 1997).

### ***Ferro no solo***

Dos minerais primários que compõem as rochas, o ferro ocorre principalmente sob a forma divalente de  $Fe^{2+}$ . À medida que as rochas vão se intemperizando, o  $Fe^{2+}$  é liberado da estrutura dos minerais primários e se oxida, dando origem a óxidos como o  $Fe^{3+}$  como, por exemplo, a goetita e a lepidocrocita, de fórmula geral  $FeOOH$ , e a hematita, de fórmula  $Fe_2O_3$  (Barbosa Filho, 1994).

Os teores de ferro dos solos são extremamente variáveis, com amplitude próxima de zero até 40%, na forma  $Fe_2O_3$ . O ferro é encontrado distribuído uniformemente ou na forma de concentrações, como nódulos, concreções, plintitas, lateritas e outros tipos de materiais localizados em determinados horizontes do solo.

Quando sua distribuição é uniforme, os óxidos de ferro conferem aos solos cores típicas avermelhadas, como, por exemplo, nos latossolos roxos, devido à presença de hematita. A presença de goetita confere cor amarela aos latossolos amarelos, e a lepidocrocita, cores alaranjadas, na forma de mosqueados, nos gleissolos. (Kampf, 1988).

A solubilidade do ferro em solos bem arejados é controlada pelo  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  e em solos reduzidos, pelo  $\text{FeCO}_3$  (Lindsay & Schwab, 1982). Nos solos arejados, o ferro solúvel representa apenas uma pequeníssima porção do ferro total. As formas inorgânicas presentes em solução são  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . Esta última forma ocorre em proporção extremamente pequena, exceto em condições de pH muito baixo (Bataglia, 1991).

### ***Ferro na planta***

O ferro é um micronutriente importante nos mecanismos de transformação energética que se fazem necessários para a síntese de diversas substâncias, e para a manutenção de processos metabólicos celulares vitais para a planta. É também um componente essencial da estrutura de várias enzimas dos grupos heme e não-heme, e de carregadores de elétrons, como a ferredoxina, substância que se sabe estar envolvida na transferência de elétrons no processo fotossíntese (Barbosa Filho, 1994).

O ferro tem papel essencial como componente de diferentes enzimas envolvidas na transferência de elétrons (reações redox), como citocromos e aquelas pertencentes aos grupos heme e não-heme, além de agir como um co-fator de enzimas essenciais envolvidas na síntese de fitohormônios (Bouzayen, 1991; Siedow, 1991). Cerca de 75% do ferro na folha está presente nos cloroplastos, como fitoferritina e ferredoxina, substância que se sabe estar envolvida na transferência de elétrons no processo fotossíntese, sendo reversivelmente oxidado de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  durante a transferência de elétrons. Portanto, a deficiência de ferro afeta em muito a fotossíntese (Taiz, 2004).

Duas outras funções são atribuídas ao ferro: a síntese da proteína ribossômica, denominada Fe-proteína, e a formação da enzima Fe-quilatase, cuja

função é suprir o ferro à cadeia do precursor da clorofila (Barbosa Filho, 1994). Embora não faça parte das moléculas de clorofila, o ferro é essencial para a sua síntese. Sob deficiência de ferro, o teor de clorofila das folhas e o número de cloroplastos diminuem, e há menor quantidade de grana nos mesmos (Santos Filho, 1988).

### ***Ferro na solução nutritiva***

Um problema significativo das soluções nutritivas é a disponibilidade de ferro, especialmente em altas concentrações como a apresentada. Quando fornecido na forma de um sal inorgânico como  $\text{FeSO}_4$  ou  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ , o ferro pode precipitar da solução como hidróxido de ferro. Se sais fosfato estão presentes, fosfato de ferro insolúvel também será formado. A precipitação do ferro na solução torna-o fisicamente indisponível à planta, a não ser que sais de ferro sejam adicionados com frequência. Pesquisadores mais antigos abordaram o problema adicionando ferro junto com ácido cítrico ou tartárico. Compostos como esses são chamados de *quelantes*, pois formam complexos solúveis com cátions, como ferro e cálcio, nos quais o cátion é retido por forças iônicas, e não por ligações covalentes. Cátions que formam quelatos são, então, fisicamente mais disponíveis às plantas (Sievers e Bailar, 1962). Soluções nutritivas mais modernas usam os produtos químicos ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA ou ácido pentético) como agentes quelantes (Taiz, 2004).

### ***Absorção de ferro***

O ferro pode ser absorvido pelas raízes das plantas tanto sob a forma de  $\text{Fe}^{2+}$  como de  $\text{Fe}^{3+}$ . No entanto, o  $\text{Fe}^{2+}$  é a forma metabolicamente ativa, e esta parece ser a forma preferencialmente absorvida pelas raízes. Como a forma predominante de ferro nos solos é o  $\text{Fe}^{3+}$ , de muito baixa solubilidade, os mecanismos de sua absorção pelas plantas diferem daqueles dos macronutrientes, que em geral apresentam maior solubilidade (Barbosa Filho, 1994).

A absorção do ferro está relacionada com a capacidade das raízes em reduzi-lo da forma férrica para a ferrosa. Esta redução é considerada uma etapa obrigatória na absorção do ferro pelas espécies Fe-eficientes. (Chaney et al., 1972).

O mecanismo de absorção de ferro pelas plantas é controlado por fatores genéticos. O mecanismo é ativado em plantas Fe-eficientes em resposta à deficiência de ferro, mas permanece inativo se o ferro estiver disponível em níveis suficientes para atender à demanda das plantas (Brown *et al.*, 1972).

### ***Características da toxidez por ferro***

As informações sobre distúrbios nutricionais no arroz causados por micronutrientes nos solos brasileiros indicam que, depois do zinco, o ferro é o elemento que com mais frequência limita a produção desta cultura, seja no plantio sob condição de sequeiro ou sob irrigação por inundação. No primeiro caso, o problema está relacionado quase sempre à deficiência do elemento, e no segundo caso, à toxidez. O principal problema do arroz irrigado, ao contrário do arroz de sequeiro, está relacionado com a toxicidade por ferro. Essa toxidez ocorre devido ao acúmulo de  $Fe^{2+}$  na solução dos solos, resultante de sua inundação. Esse acúmulo de  $Fe^{2+}$  é consequência da redução do  $Fe^{3+}$  que se encontra no solo arejado, sob a forma de óxidos de ferro de baixa solubilidade. A redução, que se verifica quando o potencial redox do solo inundado atinge a faixa de 100-300mV, pode ocasionar teores de ferro solúvel da ordem de até 600 ppm, contra teores médios em torno de 0,1 ppm em solos arejados (Brennan & Lindsay, 1998).

No Brasil, nos solos comumente cultivados com arroz irrigado, os teores de ferro solúvel após o alagamento não chegam a níveis tão elevados como os registrados em outros países tradicionais produtores de arroz. Em geral, os teores de ferro nos nossos solos não ultrapassam 100 ppm. Contudo, pesquisas realizadas sobre o assunto, até agora, indicam que não são necessários teores muito elevados de ferro na solução do solo para que ocorra a toxidez de ferro no arroz. Segundo a literatura nacional e internacional, os teores de ferro na solução do solo e na planta em que ocorre a toxidez variam, respectivamente, entre 10 e 1000 ppm e 50 e 1700 ppm. Limites tão amplos mostram claramente que o desenvolvimento da toxidez é

um fenômeno complexo, parecendo não haver um critério ou fator específico do solo ou da planta que permita prever sua ocorrência (Barbosa Filho, 1994).

A toxidez por ferro pode ser direta ou indireta. A toxidez direta está relacionada com a absorção excessiva do elemento pela planta, o que lhe danifica as células (Vahl, 1991). Da mesma forma que na deficiência de magnésio, um sintoma característico da deficiência de ferro é a clorose internervura. Ao contrário dos sintomas de deficiência de magnésio, tais sintomas aparecem inicialmente nas folhas mais jovens, onde o elemento se concentra em pequenas manchas de cor castanha – *bronzeamento* ou *bronzing* (Mengel, 1962; Bienfait, 1985). Sob condições de deficiência extrema ou prolongada, as nervuras podem tornar-se cloróticas também, fazendo com que toda folha se torne branca. Em estágios mais avançados de toxidez, ocorrem necrose, secamento e morte das folhas.

As folhas tornam-se cloróticas porque o ferro é necessário para a síntese de alguns dos complexos clorofila-proteína no cloroplasto. A baixa mobilidade do ferro deve-se, provavelmente, à sua precipitação nas folhas mais velhas na forma de óxidos ou fosfatos insolúveis ou à formação de complexos com a fitoferritina, uma proteína de ligação de ferro encontrada na folha e em outras partes da planta (Oh *et al.*, 1996). A precipitação do ferro diminui a subsequente mobilização do metal para dentro do floema, para o transporte de longa distância. Esse tipo de toxidez é pouco comum nas nossas condições, mas é frequentemente registrada em outros países, onde alguns solos desenvolvem teores muito elevados de  $Fe^{2+}$  quando inundados (Taiz, 2004).

A toxidez indireta resulta da limitação à absorção pelas plantas de diversos nutrientes, como cálcio, magnésio, potássio, fósforo e do próprio ferro, devido à precipitação do ferro sobre a epiderme das raízes do arroz. A formação de uma camada de óxido-hidróxido de  $Fe^{3+}$  bloqueia os sítios de absorção de nutrientes nas raízes, resultando em deficiências nutricionais múltiplas. Os sintomas desse tipo de deficiência consistem em atrofiamento das plantas, redução do afilhamento, alaranjamento das folhas e recobrimento das raízes por camadas avermelhadas de óxidos de ferro. Devido à deposição de ferro nas raízes, estas apresentam elevadíssimos teores do elemento e, aparentemente, os sintomas de toxidez mantêm relação bastante estreita com esses teores (Vahl, 1991; Barbosa Filho, 1994).

A toxidez indireta é a forma predominante nas condições brasileiras e a mais importante. Sua ocorrência em lavouras de arroz pode causar reduções de 10 a 80% na produtividade (Bacha, 1991). A toxidez foi constatada no Brasil na década de 70, a partir da introdução de cultivares de arroz do tipo moderno, algumas das quais têm se mostrado sensíveis ao excesso de ferro no solo. O problema já foi diagnosticado, com maior ou menor intensidade, nos estados de Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Goiás e, inclusive, no Rio Grande do Sul (Barbosa Filho, 1987).

### **Objetivos do fitomelhoramento na cultura de arroz**

A seleção das melhores plantas é uma das mais antigas atividades do homem. O melhoramento de plantas sempre foi uma técnica utilizada, embora antigamente de forma rudimentar, por muitos agricultores selecionando assim as plantas mais desejáveis através da propagação de suas sementes – o que resultou nas primeiras mudanças gênicas dirigidas, levando assim, a evolução das espécies cultivadas (Borém, 2001).

O melhoramento genético de plantas tem contribuído de forma decisiva para o incremento da produção mundial de grãos, principalmente na segunda metade do século XX (Borlaug, 1983), uma vez que os melhoristas têm como objetivo principal elevar o valor econômico das espécies por meio do aumento na produtividade de grãos, resistência à doenças e qualidade nutricional. Contudo, não só o aumento na eficiência de seleção, organização e caracterização do germoplasma, bem como a maximização dos ganhos genéticos faz parte das ações dos programas de melhoramento de plantas.

O melhoramento genético de plantas pode ser dividido em melhoramento clássico, onde se seleciona caracteres quantitativos, os quais podem possuir influência do ambiente, o que leva anos para selecionar uma nova variedade já que esta é selecionada pelo fenótipo; e o melhoramento molecular, que se baseia na seleção através do genótipo, possuindo pouca ou nenhuma influência de fatores do

ambiente, podendo selecionar características de alta e baixa herdabilidade. A utilização de marcadores moleculares (AFLP, ISSR, SSR, RFLP, entre outros) tem ajudado os melhoristas a estudarem com maior precisão e confiabilidade o caráter desejado, pois a variabilidade é acessada e selecionada em nível de DNA.

Várias ferramentas podem ser incorporadas aos programas de melhoramento, com o objetivo de otimizar a obtenção de genótipos superiores, como por exemplo, a transgenia (Ye et al., 2000), a seleção assistida por marcadores (Frary et al., 2000), a mutação induzida (Pandini et al., 1997) e a genômica (Liu, 1998).

Na cultura do arroz, a variabilidade genética foi mantida através da diferenciação geográfica, à medida que foi cultivado pelos primeiros agricultores foi sendo levado para regiões diferentes, desse modo, tipos específicos de arroz foram aparecendo para cada região (Howland, 1977; IRRI, 1985).

O arroz é considerado uma espécie modelo para estudos genético-moleculares (Moore et al., 1993), principalmente em função do tamanho pequeno do seu genoma – 389 Mb (IRGSP, 2005), da sintonia com outros genomas como trigo, milho, aveia, cevada e sorgo (Devos & Gale, 2000) e da importância econômica e social que possui. Estas características permitem que os genes correspondentes ou colineares, em diferentes gramíneas, sejam obtidos mais facilmente, levando a um enriquecimento das informações sobre os caracteres de interesse.

Entre os cereais, o arroz (*Oryza sativa* L.) é que possui as melhores características para responder aos esforços de enriquecimento dos mapas moleculares e, conseqüentemente, ser um modelo para a genômica. Dentre as principais razões, pode-se destacar o genoma relativamente pequeno quando comparado com as demais Poaceas (IRGSP, 2005), a publicação do seqüenciamento parcial das duas principais subespécies, *indica* (Yu et al., 2002) e *japonica* (Goff et al., 2002); e o seqüenciamento completo pelo International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP, 2005). Contudo, leva-se em conta, ainda, sua capacidade de rendimento, precocidade para adaptação ao ciclo vegetativo, resistência ao acamamento e às moléstias (Poehlman et al., 1965).

## Mutações

O DNA de um organismo não é uma molécula estática, sendo que frequentemente suas bases estão expostas a agentes, naturais ou artificiais, processos celulares normais e riscos ambientais inevitáveis, que provocam modificações na sua estrutura ou composição química. São denominadas mutações quaisquer modificações súbitas e hereditárias no material genético (Kreuzer & Maissey, 2002). Mutante é, então, todo organismo que exibe uma forma alterada como resultado da presença de uma mutação (Zaha, 1996).

Usado em sentido amplo, o termo mutação se refere a qualquer modificação súbita e hereditária no conjunto gênico de um organismo que não é explicável pela recombinação da variabilidade genética preexistente. Essas modificações incluem mudanças no número cromossômico (euploidia e aneuploidia), mudanças grosseiras na estrutura dos cromossomos (aberrações cromossômicas) e mudanças nos genes individuais. Atualmente, no entanto, o termo mutação é mais utilizado em sentido mais restrito, referindo-se a alterações detectadas em nível de genes individuais.

As mutações espontâneas são bastante raras e o seu reconhecimento é feito, em geral, ao acaso, principalmente através de gerações segregantes (Gaul, 1964). Mutações espontâneas que inativam um gene funcional ocorrem em bactérias na ordem de  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  eventos por locus por geração. Não existe uma maneira precisa de se determinar esta taxa para organismos eucarióticos, embora estime-se que esta seja semelhante à encontrada em bactérias (Zaha, 1996).

Duas classes de mutações, baseadas na quantidade de informação genética (DNA) que é alterada pela mutação, são normalmente conhecidas: as macromutações – mudanças em longos segmentos de moléculas de DNA, também chamados macrolesões ou aberrações cromossômicas, que incluem mudanças na quantidade total de informação genética devido à perda (deleção) ou adição (duplicação) de um gene (ou genes) ou mesmo de um cromossomo inteiro e ainda mudanças nas posições dos genes uns em relação aos outros sem nenhuma mudança na quantidade total de informação genética (inversões e translocações); e as micromutações – mudanças na seqüência de nucleotídeos de um único gene também denominadas microlesões ou mutações pontuais, pois uma pequena quantidade de DNA é alterada (Kreuzer & Maissey, 2002).

O uso direto de mutações é um processo valioso, especialmente quando o melhoramento de uma ou duas características facilmente identificáveis é desejado numa variedade bem adaptada. As mutações benéficas podem estar acompanhadas de efeitos colaterais desfavoráveis causados por ligações próximas a tais características ou efeitos pleiotrópicos que não podem ser corrigidos. Esta desvantagem pode ser minimizada com a indução de mutação num grande número de indivíduos independentes para o tipo desejável e a seleção daqueles com menores níveis de caracteres indesejáveis (Przybyla, 1994).

### ***Agentes Mutagênicos***

Uma vez que taxa de mutação espontânea encontrada na natureza é muito baixa, a mutação induzida tem sido amplamente utilizada para elevar as freqüências de mutações e variações que podem ser induzidas tanto por tratamento com mutagênicos químicos como substâncias alquilantes quanto físicos como radiações ionizantes (Predieri, 2001).

O uso de diferentes mutagênicos físicos e químicos tem despertado grande interesse visto que implica em aumento da freqüência de mutações, o que acentua as chances de encontrar mutações de interesse ao melhoramento (Guimarães & Ando, 1980). Muitas substâncias são conhecidas devido a sua ação mutagênica, entre elas podem ser destacadas as radiações ionizantes. Estas são usualmente provenientes de radioisótopos como o Cobalto-60 e o Césio-137. Estes radioisótopos emitem radiações como os raios gama e os raios-x, sendo que os primeiros possuem maior comprimento de onda (Briggs & Constantin, 1977). A utilização de radiações ionizantes através de raios gama nos diferentes tecidos vegetais tem como alvo principal as modificações de moléculas de DNA, sendo que a energia transferida pelas radiações resulta em ionização no interior da célula. Cada ionização envolve a saída de um elétron de um átomo e sua captura por outro átomo, sendo estes pares de átomos altamente reativos e fisicamente instáveis (Brewbaker, 1969). A interação da energia de radiação com o DNA pode causar quebras de fita simples ou dupla, destruição de bases nitrogenadas, rompimento de pontes de hidrogênio e indução de pontes entre proteínas e DNA (Ahnström, 1977).

Diversos tecidos da planta podem ser irradiados, como sementes, grãos de pólen, meristemas, calos ou mesmo a planta inteira (Briggs & Constantin, 1977). As sementes têm sido mais utilizadas no processo de irradiação por facilitar o uso de diferentes dosagens e permitir condições de maior controle, especialmente no teor de umidade. Além disso, um grande número de sementes podem ser tratadas com maior facilidade de estocagem e manuseio posterior ao tratamento.

Vários mutagênicos químicos podem ser utilizados, com destaque para os agentes alquilantes. Neste grupo os mais utilizados são: Metano Sulfonato de Etila – EMS, Metano Sulfonato de Metila – MMS e di-Etil Sulfato – dES. Os mesmos são compostos com um ou mais grupos alquila que podem ser transferidos para outras moléculas, em posições de densidade elétrica alta, reagindo com o DNA por alquilação dos grupos fosfato ou das bases nitrogenadas (Heslot, 1977).

### ***Utilidades de cultivares tolerantes***

Uma base genética estreita reduz, principalmente, a eficiência no processo de seleção e o ajuste de uma nova constituição genética a ambientes distintos. A utilização de agente mutagênicos físicos e químicos pode ser de fundamental importância para a criação e incorporação de novos genes de interesse agrônomo, podendo resultar em genótipos mais estáveis e mais adaptados às condições edafoclimáticas do Sul do Brasil (Coimbra, 2005). Na verdade, a mutação é a fonte básica de variabilidade genética, fornecendo a matéria-prima para a evolução. Sem a mutação, todos os genes existiriam apenas em uma forma, e os organismos não seriam capazes de se adaptar às condições ambientais (Zaha, 1996).

A obtenção de variabilidade mediante o emprego de agentes mutagênicos tem sido amplamente empregada no melhoramento vegetal, em função da capacidade de alterar uma ou mais características desejáveis, melhorando assim as cultivares já existentes e desenvolvendo novos genótipos (Maluszinski, 1998).

Dentre as utilidades dos mutantes produzidos para os programas de melhoramento podemos destacar: mudanças morfo-fisiológicas, mutações de um simples gene, mutações gênicas para caracteres quantitativos, quebra de ligações gênicas e indução de genes marcadores (Poehlman, 1986).

Uma cultivar de arroz irrigado desenvolvida para o cultivo na região subtropical, atualmente, deve apresentar características importantes como: elevado potencial produtivo; alta qualidade industrial, comercial e culinária do grão; e tipo de grão, ciclo biológico e altura da planta adequados à colheita mecanizada. Também, devem ter reação de resistência às doenças e insetos; e tolerância ao frio; à toxicidade por ferro e à salinização do solo e da água. Em síntese, a cultivar deve ter produtividade alta e estável, com tipo e qualidade (intrínseca) de grão que atendam às necessidades e preferências do usuário do arroz (Azambuja *et al.*, 1996).

### **Marcadores Moleculares**

Desde a pré-história o homem seleciona e melhora espécies vegetais, animais e microbianas baseado no fenótipo. Do ponto de vista do melhoramento clássico, os ganhos genéticos são decorrentes da variabilidade genética, da herdabilidade do caráter, da eficácia e intensidade da seleção e do tempo necessário para a realização de um ciclo de seleção. No entanto, do ponto de vista da biologia molecular, muitos aspectos ainda não foram elucidados, tais como o número e o efeito dos genes envolvidos na expressão de um caráter, bem como a localização e função fisiológica de cada um.

Os marcadores moleculares são biomoléculas que podem ser relacionadas com uma característica genética que produz efeito fenotípico. As biomoléculas consideradas marcadores moleculares podem ser proteínas (antígenos ou isoenzimas) ou um segmento específico de DNA, cuja seqüência básica difere para diferentes genótipos (polimórfico) e, portanto, permite diferenciá-los.

Quando vários marcadores moleculares, em diferentes posições no genoma, encontram-se associados a uma mesma característica, constituem QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Quando um mesmo marcador molecular encontra-se em todos os indivíduos analisados trata-se de um **marcador monomórfico**, mas quando apresenta diferenças no peso molecular, atividade enzimática, estrutura, ou

sítios de restrição, na comparação com diferentes indivíduos, se diz que é um **marcador polimórfico**.

Os marcadores moleculares ideais são aqueles que possuem elevado polimorfismo entre dois genótipos, herança codominante (capacidade de diferenciar genótipos homozigotos de heterozigotos em organismos diplóides), são distribuídos uniformemente por todo o genoma, facilmente visualizados e estáveis no decorrer das gerações.

Até os anos 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram aqueles controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral utilizaram-se fenótipos de fácil identificação visual tais como nanismo, deficiência clorofílica, cor de flor e morfologia foliar.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram metodologias alternativas para detectar polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. As enzimas de restrição foram empregadas para detectar polimorfismo de fragmentos de restrição pela primeira vez em 1974. Mais tarde, esta estratégia seria combinada com técnicas de hibridizações para criar a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Um salto extraordinário foi dado em 1987 com o desenvolvimento da metodologia *in vitro* para sintetizar moléculas de DNA a partir de um molde. Esta metodologia é amplamente conhecida como Reação em Cadeia da Polimerase, que vem do inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR. A partir deste evento surgiu uma série de novas técnicas de marcadores moleculares, todas utilizando PCR.

Atualmente, as técnicas mais empregadas nos programas de melhoramento e que utilizam a reação em cadeia da polimerase são: i) a técnica microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*); ii) a técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); iii) a técnica SCARs (*Sequence Characterized Amplification Region*); e iv) a técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Estas técnicas permitem obter um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo. O número de técnicas de marcadores moleculares já descritas e utilizadas no melhoramento de plantas e na biologia de plantas é cada vez mais numeroso. Para facilitar o entendimento, as diferentes tecnologias são agrupadas em três categorias: i) marcadores bioquímicos; ii) marcadores baseados em hibridização do DNA; e iii) marcadores baseados na amplificação do DNA (Malone & Zimmer, 2005).

### ***AFLP (Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados)***

Técnica compreendida dentro da categoria de marcadores baseados na amplificação do DNA. No ano de 1993, ZABEU e seus colaboradores desenvolveram a técnica AFLP, que apresenta especificidade, resolução e representatividade da digestão com enzimas de restrição, utilizada na técnica de RFLP, e a praticidade e velocidade de detecção de polimorfismo utilizando PCR que é utilizada no RAPD. O procedimento baseia-se em 4 etapas principais: i) digestão do DNA genômico com enzimas de restrição; ii) ligação de adaptadores específicos às extremidades dos fragmentos de restrição; iii) pré-amplificação e ampliações seletivas, utilizando *primers* complementares aos adaptadores; e iv) eletroforese em géis de poliacrilamida com posterior coloração dos fragmentos.

O polimorfismo gerado por AFLP resulta de mutações pontuais, inversões, deleções e inserções no DNA, as quais geram modificações (perdas ou ganhos) nos sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição, alterações na seqüência reconhecida pelas bases seletivas no extremo 3' dos *primers* utilizados para a amplificação ou alteram o tamanho do fragmento gerado.

AFLP é uma das técnicas de marcadores moleculares mais utilizadas atualmente para o desenvolvimento de *fingerprintings*, mapeamento gênico, construção de mapas genéticos e análises de divergência genética, principalmente em espécies que apresentam baixa taxa de polimorfismo no DNA. Além disso, devido a sua capacidade de amplificar um elevado número de *locus* por reação permite acessar ao polimorfismo genético ao nível de genoma completo.

Duas desvantagens são apresentadas como as mais importantes em relação à técnica de AFLP: i) a necessidade de preparação das amostras para o trabalho, envolvendo as etapas de digestão, ligação de adaptadores e pré-amplificação; ii) o tempo requerido para a análise visual dos dados, quando não é feita de forma automatizada, mediante programas computacionais que realizam a avaliação de bandas sobre uma foto digitalizada do gel (Malone & Zimmer, 2005).

## OBJETIVOS

### GERAL

Avaliar genótipos mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à toxidez por ferro a nível morfológico e molecular.

### ESPECÍFICO

Avaliar as respostas, em cultivo hidropônico, de famílias mutantes de arroz à toxidez por ferro;

Estudar o incremento de variabilidade genética originadas pela mutação entre as famílias mutantes utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP;

Calcular a dissimilaridade genética a partir de dados moleculares;

Identificar combinações genéticas promissoras que possam ser utilizadas como fonte de genes em cruzamentos artificiais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção de genótipos mutantes

O trabalho de mutação foi realizado no Laboratório de Di-haplóides e Hidroponia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em parceria com o Centro Regional de Oncologia (UFPel), localizado no município de Pelotas - RS (Zimmer et al., 2003).

Sementes de arroz da cultivar BRS-7-Taim, foram irradiadas com raios Gama provenientes do Cobalto ( $^{60}\text{Co}$ ), em um aparelho denominado Eldorado 78 onde o rendimento do aparelho para um campo de 30 x 30 a 25 cm da fonte, foi de 37,9 cGy (centigrays)  $\text{min}^{-1}$ . Para estabelecer a dosagem mais adequada, foi desenvolvido um estudo preliminar variando a dosagem para estabelecer o efeito das ondas ionizantes do  $^{60}\text{Co}$  sobre a germinação das sementes. Nesse estudo, seis tratamentos foram realizados, com as seguintes doses, 0, 25, 50, 100, 200, 400 Gy. Cada tratamento foi constituído de uma amostra de 200 sementes que foram submetidas ao tratamento com água destilada por uma hora, após a irradiação as sementes permaneceram por mais uma hora em água corrente, sendo estabelecida a dose de 250 Gy para a indução de mutação em arroz cultivar BRS-7-Taim (Zimmer et al., 2003).

A seguir, 3000 sementes previamente hidratadas conforme descrito anteriormente foram irradiadas a uma dose de 250 Gy constituindo a população M<sub>1</sub>. Estas sementes após lavagem em água corrente por uma hora foram semeadas em campo experimental para avanço de geração. Durante a geração M<sub>5</sub> foram selecionados mutantes para diversas características dando origem às famílias utilizadas neste estudo (Tabela 1) (Zimmer *et al.*, 2002).

Tabela 1. Relação dos genótipos utilizados para análise.

N°	Família	N°	Família	N°	Família
1	CGF-Z-M05-435	14	CGF-Z-M05-328	27	CGF-Z-M05-65
2	CGF-Z-M05-437	15	CGF-Z-M05-62 ARS2	28	CGF-Z-M05-31 ARS3
3	CGF-Z-M05-78 ARS1	16	CGF-Z-M05-440	29	CGF-Z-M05-168
4	CGF-Z-M05-243	17	CGF-Z-M05-436	30	CGF-Z-M05-59
5	CGF-Z-M05-45	18	CGF-Z-M05-78 ARS	31	CGF-Z-M05-444 P1
6	CGF-Z-M05-188	19	CGF-Z-M05-280	32	CGF-Z-M05-204
7	CGF-Z-M05-42	20	CGF-Z-M05-205	33	CGF-Z-M05-41
8	CGF-Z-M05-44	21	CGF-Z-M05-260 P1	34	CGF-Z-M05-295
9	CGF-Z-M05-79	22	CGF-Z-M05-189	35	CGF-Z-M05-32
10	CGF-Z-M05-121 ARS	23	CGF-Z-M05-167	36	CGF-Z-M05-EPAGRI 108
11	CGF-Z-M05-258	24	CGF-Z-M05-417 ARP	37	CGF-Z-M05-IRGA 409
12	CGF-Z-M05-53	25	CGF-Z-M05-336	38	CGF-Z-M05-TAIM
13	CGF-Z-M05-22 P	26	CGF-Z-M05-192		

## Hidroponia

Foram utilizados 35 genótipos mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) na geração M<sub>5</sub>, já caracterizados em estudos preliminares como tolerantes ao frio no período germinativo (Martins *et al.*, 2005) e também quanto à tolerância à toxidez por alumínio (Malone, 2005). Foram adicionadas ao experimento a cultivar TAIM (que deu origem as famílias mutantes), a cultivar IRGA 409 e a cultivar EPAGRI 108 como testemunhas, designadas como genótipo sensível e tolerante, respectivamente. O experimento foi conduzido no Laboratório de Di-haplóides e Hidroponia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento FAEM/UFPel, e o delineamento utilizado foi o de blocos casualizado, com três repetições, tendo 10 plantas por genótipo em cada repetição.

Para o estabelecimento do experimento, as sementes utilizadas passaram por processo de desinfestação em hipoclorito de sódio 1% durante 10 minutos, sendo então lavadas três vezes em água destilada para posterior acondicionamento em caixas Gerbox contendo papel filtro umedecido com água destilada. As sementes foram então mantidas em câmara germinadora (BOD) a 26°C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 100% por 72 horas.

As sementes germinadas com aproximadamente 5 mm de raiz foram transportadas para uma tela de nylon adaptada à tampa de um recipiente (balde) com capacidade para 5,5 L, contendo solução nutritiva conforme descrita por Camargo (1981), composta por:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  4 $\mu\text{M}$ ;  $\text{MgSO}_4$  2 $\mu\text{M}$ ;  $\text{KNO}_3$  4 $\mu\text{M}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,435 $\mu\text{M}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnSO}_4$  2 $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$  0,3 $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4$  0,8 $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaCl}$  30 $\mu\text{M}$ ;  $\text{Fe-EDTA}$  10 $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaMoSO}_4$  0,10  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  10 $\mu\text{M}$ . Os recipientes, cada um contendo um total de 100 plantas, foram colocados em um tanque hidropônico com água a uma temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  com iluminação e aeração permanente.

As plântulas se desenvolveram nessas condições por 14 dias e, subseqüentemente, foram transferidas para os recipientes contendo solução nutritiva e sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) na concentração de 9 mM (Silva, 2003), permanecendo nestas condições por 7 dias a um pH de 4,0 sendo controlado diariamente.

Devido à ocorrência do processo de precipitação do ferro, foi utilizado o agente quelante EDTA em valor equimolar (Sillanpää, 1996) a dose de ferro adicionada à solução, ou seja, 9 mM.

Após este período foram avaliadas as seguintes variáveis: número de raízes (NR), comprimento da raiz principal (CRP), comprimento do coleóptilo (CC), inserção da primeira folha (IPF), comprimento da primeira folha (CPF), comprimento da segunda folha (CSF) e comprimento da parte aérea (CPA).

Seguidamente, os dados morfológicos foram submetidos às análises estatísticas de variância fatorial com ajuda do programa Genes (Cruz, 1997) e análise de comparação de média pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro através do programa SAS 8.1 (Statistical Analysis System). Por último foi calculada a correlação entre as variáveis utilizadas no estudo. Com base nestas variáveis foi calculado o desempenho relativo das famílias na dose de 9 mM de ferro tomando como 100% o valor da variável no tratamento controle.

## Biologia Molecular

### *Material Vegetal*

Dez sementes das 35 famílias mutantes e a cultivar TAIM (como genótipo testemunha não mutado) foram semeadas em baldes e mantidas em estufa com temperatura e umidade controlada para favorecer seu crescimento até obter folhas jovens suficientes para realizar a extração do material genético. O DNA das plantas de cada família foi extraído utilizando o método CTAB descrito por Saghai-Marooof (1984). O produto da extração foi quantificado em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo na concentração final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  para ser visualizado em luz UV (Sambrook *et al.*, 1989)

### *Análise de AFLP*

A técnica de marcadores moleculares AFLP (*Amplified Fragments Length Polimorphism*) (Vos *et al.*, 1995) foi escolhida para a análise genótipos mutantes por ser uma técnica com elevado índice de *multiplex* (aproximadamente 40 locos amplificados por combinação de *primers*, resultado que depende também da espécie utilizada), permitindo assim acessar todo o genoma do organismo.

A técnica AFLP foi aplicada sobre as 35 famílias e a testemunha, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (*Life technologies – GIBCO®*). Aproximadamente 100 ng de DNA, foi digerido com duas enzimas de restrição (*EcoRI* e *MseI*) durante três horas, a 37°C. Ao produto da digestão foi adicionada a solução de adaptadores específicos e incubado por duas horas a 20°C na presença da enzima T4 DNA Ligase. Uma diluição de 1/10 em tampão TE pH 8.0 foi realizada e utilizada como molde para a reação de pré-amplificação. Uma nova diluição 1/50 em tampão TE pH 8.0 foi realizada e utilizada como estoque para as reações de amplificação seletivas. As reações de digestão com enzimas de restrição, ligação de adaptadores específicos, pré-

amplificação e amplificação seletiva foram realizadas em um termociclador PTC-100. A reação de pré-amplificação utilizando *primers* com uma base seletiva foi realizada de acordo com o seguinte protocolo de PCR: desnaturação a 94°C por 30s; anelamento a 56°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min durante 20 ciclos. A reação de amplificação final utilizando *primers* com três bases seletivas foi realizada de acordo com o seguinte protocolo de PCR: desnaturação a 94 °C por 30s; anelamento a 65°C (-0,7°C/ciclo) por 30s e extensão a 72°C por 60s durante 11 ciclos, seguido de mais 30 ciclos da seguinte configuração: desnaturação a 94°C por 30s; anelamento a 56°C por 30s e extensão a 72°C por 60s. Foi testado um total de 9 combinações de *primers* (Tabela 2).

Ao produto de amplificação foi adicionado 2/3 do seu volume de tampão de carga (98% formamida, 10 mM EDTA pH 8.0, azul de bromofenol e xileno cianol), seguido de desnaturação a 94°C durante 6 minutos e aplicação no gel de acrilamida 6% em condições desnaturantes. A corrida eletroforética foi realizada em cuba de seqüenciamento manual modelo HOEFER SQ3 *Sequencer* durante aproximadamente 2h com potência constante de 60 watts. A revelação dos fragmentos amplificados foi realizada de acordo com o protocolo de coloração com nitrato prata (Briard *et al*, 2000).

Os dados de presença/ausência de bandas obtidos na análise de AFLP das 35 famílias e a testemunha analisada permitiram o cálculo da dissimilaridade genética entre todos os pares de genótipos, com o auxílio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000). Com base na matriz de dissimilaridade gerada foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Averages*).

Para a verificação do ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma obtido foi calculado o coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ), segundo Sokal & Rohlf (1962). Foi calculado o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para estimar quanto da variação observada foi ao acaso. Como a estabilidade estatística das estimativas de similaridade genética pode ser influenciada pela amostragem (Efron & Tibshirani, 1993), a estabilidade dos agrupamentos foi computada pela análise de *Bootstrapping* com 1000 replicações utilizando o programa computacional Winboot (Yap & Nelson, 1996), sendo para este

cálculo utilizada a matriz binária. A distância genética média foi utilizada como ponto de corte para a formação dos grupos.

Tabela 2. Relação das 9 Combinações de *primers* utilizadas na análise de AFLP.

Combinação de <i>primers</i>
<i>M-CAA; E-AGG</i>
<i>M-CTA; E-ACA</i>
<i>M-CAC; E-AAC</i>
<i>M-CAG; E-ACC</i>
<i>M-CAT; E-AGC</i>
<i>M-CTG; E-ACT</i>
<i>M-CAA; E-AAC</i>
<i>M-CAA; E-AGC</i>
<i>M-CTG; E-AGG</i>

#### *Cálculo da frequência alélica*

Para o cálculo da frequência alélica foi estipulado o índice de presença de cada um dos 186 marcadores analisados nos 36 genótipos avaliados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Hidroponia

Os resultados da análise de variância (Tabela 3) evidenciaram que as sete variáveis avaliadas obtiveram diferença estatística no fator Genótipo. Apenas as variáveis NR, CRP, CC e CPA apresentaram diferença estatística no fator Dose. Na interação Genótipo x Dose foi observado diferença estatística nas variáveis NR e CC. Estes resultados indicam que os genótipos respondem diferentemente aos tratamentos, implicando assim no desmembramento de cada um dos genótipos para análises de comparação de médias.

Tabela 3. Resumo da análise de variância.

F.V	G.L	Quadrados Médios						
		NR	CRP	CC	IPF	CPF	CSF	CPA
<b>Genótipo</b>	37	4,59*	24,26*	0,05*	1,32*	10,76*	1,57*	25,12*
<b>Dose</b>	1	26,13*	216,52*	0,26*	1,32	15,34	0,04	859,49*
<b>Gen x Dose</b>	37	3,82*	12,62	0,67*	0,54	6,39	0,53	14,68
<b>Erro</b>	150	1,36	14,18	0,02	0,47	6,11	0,47	11,79
<b>Média</b>		5,08	9,60	0,55	3,46	11,85	3,21	16,91
<b>C.V</b>		22,98	39,21	25,48	20,01	20,87	21,38	20,31

\* Significativo a 5% de probabilidade

Da análise de comparação de médias das famílias em relação a cultivar EPAGRI 108 na dose de 0 mM pelo teste de Dunnett (Tabela 4) observou-se que apenas três dos sete caracteres avaliados apresentaram famílias com

média diferente estatisticamente à testemunha. A variável que apresentou maior número de famílias com diferença estatística foi NR com 5 famílias.

Tabela 4. Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à testemunha tolerante EPAGRI 108 na dose de 0 mM de ferro.

Família	NR	CRP	CC	IPF	CPF	CSF	CPA
EPAGRI 108	4,1	9,9	0,6	3,6	11,6	2,4	17,6
5	8,2*	12,8	0,7	3,8	13,7	3,2	20,7
3	8,0*	13,9	0,6	4,1	14,1	3,8	22,0
13	7,9*	7,2	0,7	3,7	12,1	3,6	19,4
18	7,8*	15,0	0,6	3,8	14,1	3,6	21,4
19	7,3*	12,7	0,7	4,1	12,7	3,5	20,4
2	6,8	11,6	1,4*	3,6	11,8	3,3	18,6
8	6,8	12,4	0,6	3,7	12,2	3,5	19,4
17	6,8	11,8	0,7	3,7	14,6	3,3	21,7
14	6,7	15,5	0,5	4,0	13,7	3,5	21,1
15	6,7	13,9	0,8	4,0	14,8	3,5	22,3
20	6,5	11,4	0,8	4,6	14,6	4,1*	23,3
9	6,4	11,0	0,6	4,0	13,9	2,9	20,8
16	6,4	12,3	0,7	3,9	13,2	3,6	20,6
1	6,3	8,6	0,7	3,2	10,6	2,6	16,5
11	6,1	13,3	0,6	3,8	13,2	3,9	20,9
10	6,1	11,3	0,6	4,4	14,0	3,8	22,1
4	5,5	7,3	0,5	2,1	8,4	1,8	12,3
12	5,3	4,4	0,4	3,0	10,6	2,8	16,4
38	5,3	6,2	0,5	2,9	11,7	3,0	17,6
34	5,0	9,6	0,6	3,4	11,9	3,5	18,9
22	4,8	8,9	0,6	4,2	13,9	4,2	22,3
33	4,8	10,2	0,6	4,4	13,3	4,0	21,7
35	4,6	10,8	0,5	4,1	12,8	3,9	20,8
32	4,5	10,8	0,5	3,8	12,3	3,6	19,7
27	4,4	8,5	0,5	3,3	10,4	3,4	17,1
30	4,4	9,6	0,5	3,9	13,6	3,8	21,3
31	4,4	10,4	0,6	3,7	11,0	3,7	18,3
29	4,3	11,0	0,5	3,2	10,5	3,5	17,1
7	4,2	9,8	0,4	2,1	8,8	2,4	13,3
21	3,8	10,2	0,5	3,5	11,2	2,8	17,5
28	3,8	6,6	0,4	3,1	10,7	2,5	16,3
25	3,6	8,5	0,4	3,4	11,3	3,2	18,0
23	3,5	8,5	0,4	2,9	11,5	2,2	16,5
24	3,3	21,3	0,5	3,5	12,9	4,0	20,4
26	3,1	5,7	0,3	2,1	8,4	1,6	12,1
6	3,0	7,0	0,3	1,9	6,5	1,5	9,9
37	2,8	7,1	0,5	1,9	6,9	1,6	8,5

\* Significativo a 5% de probabilidade

Tabela 5. Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à testemunha sensível IRGA 409 na dose de 0 mM de ferro.

Família	NR	CRP	CC	IPF	CPF	CSF	CPA
IRGA 409	2,8	7,1	0,5	1,9	6,9	1,6	8,5
5	8,2*	12,8	0,7	3,8	13,7*	3,2	20,7*
3	8,0*	13,9	0,6	4,1*	14,1*	3,8*	22,0*
13	7,9*	7,2	0,7	3,7*	12,1*	3,6*	19,4*
18	7,8*	15,0	0,6	3,8*	14,1*	3,6*	21,4*
19	7,3*	12,7	0,7	4,1*	12,7*	3,5*	20,4*
2	6,8*	11,6	1,4*	3,6*	11,8	3,3*	18,6*
8	6,8*	12,4	0,6	3,7*	12,2*	3,5*	19,4*
17	6,8*	11,8	0,7	3,7*	14,6*	3,3	21,7*
14	6,7*	15,5	0,5	4,0*	13,7*	3,5*	21,1*
15	6,7*	13,9	0,8	4,0*	14,8*	3,5*	22,3*
20	6,5*	11,4	0,8	4,6*	14,6*	4,1*	23,3*
9	6,4*	11,0	0,6	4,0*	13,9*	2,9	20,8*
16	6,4*	12,3	0,7	3,9*	13,2*	3,6*	20,6*
1	6,3*	8,6	0,7	3,2	10,6	2,6	16,5
11	6,1*	13,3	0,6	3,8*	13,2*	3,9*	20,9*
10	6,1*	11,3	0,6	4,4*	14,0*	3,8*	22,1*
4	5,5*	7,3	0,5	2,1	8,4	1,8	12,3
12	5,3*	4,4	0,4	3,0	10,6	2,8	16,4
38	5,3*	6,2	0,5	2,9	11,7*	3,0	17,6
34	5,0	9,6	0,6	3,4*	11,9	3,5*	18,9*
22	4,8	8,9	0,6	4,2*	13,9*	4,2*	22,3*
33	4,8	10,2	0,6	4,4*	13,3*	4,0*	21,7*
35	4,6	10,8	0,5	4,1*	12,8*	3,9*	20,8*
32	4,5	10,8	0,5	3,8*	12,3*	3,6*	19,7*
27	4,4	8,5	0,5	3,3	10,4	3,4*	17,1
30	4,4	9,6	0,5	3,9*	13,6*	3,8*	21,3*
31	4,4	10,4	0,6	3,7*	11,0	3,7*	18,3*
29	4,3	11,0	0,5	3,2	10,5	3,5*	17,1
7	4,2	9,8	0,4	2,1	8,8	2,4	13,3
36	4,1	9,9	0,6	3,6*	11,6	2,4	17,6
21	3,8	10,2	0,5	3,5*	11,2	2,8	17,5
28	3,8	6,6	0,4	3,1	10,7	2,5	16,3
25	3,6	8,5	0,4	3,4*	11,3	3,2*	18,0*
23	3,5	8,5	0,4	2,9	11,5*	2,2	16,5
24	3,3	21,3	0,5	3,5*	12,9*	4,0*	20,4*
26	3,1	5,7	0,3	2,1	8,4	1,6	12,1
6	3,0	7,0	0,3	1,9	6,5	1,5	9,9

\*Significativo a 5% de probabilidade

As variáveis CC e CSF apresentaram apenas uma família com diferença estatística cada, sendo elas 2 e 20, respectivamente. Contudo, todas as

famílias que apresentaram médias estatisticamente diferentes à testemunha tolerante obtiveram médias superiores à mesma.

Da análise de comparação de médias das famílias em relação a cultivar IRGA 409 na dose de 0 mM pelo teste de Dunnett (Tabela 5) observou-se que apenas um dos sete caracteres avaliados (CRP) não apresentou famílias com médias estatisticamente diferentes à testemunha. A variável que apresentou maior número de famílias com diferença estatística foi o IPF com 25. Nenhuma das famílias que apresentaram diferença estatística obtiveram médias inferiores à testemunha sensível no tratamento controle.

Da análise de comparação de médias das famílias em relação a cultivar TAIM na dose de 0 mM pelo teste de Dunnett (Tabela 6) observou-se que em apenas um dos sete caracteres avaliados houve família com média diferente estatisticamente à testemunha. A variável que apresentou diferença estatística foi o CC, na família 2.

Tabela 6. Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à testemunha TAIM na dose de 0 mM de ferro.

Família	NR	CRP	CC	IPF	CPF	CSF	CPA
TAIM	5,3	6,2	0,5	2,9	11,7	3,0	17,6
5	8,2	12,8	0,7	3,8	13,7	3,2	20,7
3	8,0	13,9	0,6	4,1	14,1	3,8	22,0
13	7,9	7,2	0,7	3,7	12,1	3,6	19,4
18	7,8	15,0	0,6	3,8	14,1	3,6	21,4
19	7,3	12,7	0,7	4,1	12,7	3,5	20,4
2	6,8	11,6	1,4*	3,6	11,8	3,3	18,6
8	6,8	12,4	0,6	3,7	12,2	3,5	19,4
17	6,8	11,8	0,7	3,7	14,6	3,3	21,7
14	6,7	15,5	0,5	4,0	13,7	3,5	21,1
15	6,7	13,9	0,8	4,0	14,8	3,5	22,3
20	6,5	11,4	0,8	4,6	14,6	4,1	23,3
9	6,4	11,0	0,6	4,0	13,9	2,9	20,8
16	6,4	12,3	0,7	3,9	13,2	3,6	20,6
1	6,3	8,6	0,7	3,2	10,6	2,6	16,5
11	6,1	13,3	0,6	3,8	13,2	3,9	20,9
10	6,1	11,3	0,6	4,4	14,0	3,8	22,1
4	5,5	7,3	0,5	2,1	8,4	1,8	12,3
12	5,3	4,4	0,4	3,0	10,6	2,8	16,4
34	5,0	9,6	0,6	3,4	11,9	3,5	18,9
22	4,8	8,9	0,6	4,2	13,9	4,2	22,3
33	4,8	10,2	0,6	4,4	13,3	4,0	21,7
35	4,6	10,8	0,5	4,1	12,8	3,9	20,8
32	4,5	10,8	0,5	3,8	12,3	3,6	19,7
27	4,4	8,5	0,5	3,3	10,4	3,4	17,1
30	4,4	9,6	0,5	3,9	13,6	3,8	21,3
31	4,4	10,4	0,6	3,7	11,0	3,7	18,3
29	4,3	11,0	0,5	3,2	10,5	3,5	17,1
7	4,2	9,8	0,4	2,1	8,8	2,4	13,3
36	4,1	9,9	0,6	3,6	11,6	2,4	17,6
21	3,8	10,2	0,5	3,5	11,2	2,8	17,5
28	3,8	6,6	0,4	3,1	10,7	2,5	16,3
25	3,6	8,5	0,4	3,4	11,3	3,2	18,0
23	3,5	8,5	0,4	2,9	11,5	2,2	16,5
24	3,3	21,3	0,5	3,5	12,9	4,0	20,4
26	3,1	5,7	0,3	2,1	8,4	1,6	12,1
6	3,0	7,0	0,3	1,9	6,5	1,5	9,9
37	2,8*	7,1	0,5	1,9	6,9	1,6	8,5

\*Significativo a 5% de probabilidade

Analisando as famílias acima citadas em relação à cultivar EPAGRI 108T, porém na dose de 9 mM (Tabela 7) observou-se que apenas um dos sete caracteres avaliados obteve família com média diferente estatisticamente à testemunha. A variável que apresentou diferença estatística foi IPF, na família 37.

Tabela 7: Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à cultivar EPAGRI 108 na dose de 9 mM de ferro.

Família	NR	CRP	CC	IPF	CPF	CSF	CPA
EPAGRI 108	3,8	7,9	0,5	3,2	11,1	2,8	14,3
7	5,8	9,2	0,6	3,4	12,3	3,3	15,7
34	5,8	6,4	0,6	3,8	12,2	3,4	16,0
13	5,8	11,1	0,6	3,6	11,0	3,3	14,7
26	5,8	8,1	0,5	3,0	11,6	2,6	14,7
22	5,5	8,8	0,6	3,5	12,7	3,5	16,2
8	5,4	9,3	0,6	3,6	12,9	3,8	16,4
21	5,3	7,5	0,5	3,3	10,3	2,9	13,6
4	5,2	8,0	0,5	3,7	12,6	3,3	16,3
35	5,1	8,7	0,6	3,9	13,3	3,6	17,2
23	5,1	9,0	0,4	3,4	13,3	2,3	16,6
30	5,0	7,9	0,6	3,6	12,3	3,1	15,9
3	5,0	9,8	0,6	3,7	13,1	3,8	16,9
20	5,0	6,7	0,5	3,9	12,3	3,4	16,2
12	4,9	6,7	0,5	3,4	12,4	3,1	15,8
28	4,9	7,1	0,5	3,7	12,1	3,2	15,7
5	4,8	9,0	0,5	3,9	12,5	3,8	16,4
1	4,8	8,1	0,6	3,6	12,1	3,3	15,7
32	4,8	9,8	0,6	3,7	11,6	3,5	15,2
27	4,7	7,1	0,6	3,4	11,2	3,0	14,6
18	4,7	8,4	0,5	2,7	9,8	2,4	12,5
29	4,7	10,9	0,5	3,3	11,6	3,5	15,0
11	4,6	11,5	0,4	3,4	10,7	3,6	14,2
25	4,6	9,2	0,5	3,5	11,4	3,6	14,9
14	4,5	9,1	0,5	3,6	13,3	3,6	16,9
15	4,5	6,6	0,5	2,9	9,5	2,7	12,4
6	4,4	8,5	0,4	3,2	11,7	3,2	14,9
9	4,4	10,5	0,5	3,3	11,5	3,2	14,7
38	4,4	6,2	0,5	2,5	10,1	2,5	12,5
19	4,4	7,5	0,5	3,6	11,7	3,1	15,2
31	4,3	8,1	0,5	3,4	11,0	3,4	14,3
24	4,3	11,4	0,5	3,5	12,0	3,6	15,5
16	4,3	9,1	0,4	3,1	10,6	2,9	13,7
2	4,2	7,9	0,4	3,6	11,4	3,4	14,9
17	4,2	9,8	0,5	3,2	10,5	2,9	13,8
33	4,2	9,0	0,5	3,6	12,7	3,4	16,2
10	4,1	7,2	0,4	3,3	11,2	3,7	14,5
37	1,9	5,6	0,3	1,4	5,4	1,5	6,9

\*Significativo a 5% de probabilidade

Quando analisadas em relação à cultivar IRGA 409, também na dose de 9 mM (Tabela 8) observou-se famílias com diferença estatística em todas as variáveis, exceto CRP. Das variáveis que apresentaram diferença estatística, a que obteve no maior número de famílias foi IPF, com 35, e a que menor

número apresentou foi CC, com uma. Todas médias que diferiram estatisticamente da testemunha sensível apresentaram valores superiores à mesma, sugerindo que a indução de mutações foi eficiente, possivelmente melhorando a resposta a concentrações tóxicas de ferro.

Tabela 8: Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro das famílias em relação à cultivar IRGA 409 na dose de 9 mM de ferro.

Família	NR	CRP	CC	IPF	CPF	CSF	CPA
IRGA 409	1,9	5,6	0,3	1,4	5,4	1,5	6,9
7	5,8*	9,2	0,6	3,4*	12,3*	3,3	15,7*
34	5,8*	6,4	0,6	3,8*	12,2*	3,4*	16,0*
13	5,8*	11,1	0,6	3,6*	11,0	3,3	14,7*
26	5,8*	8,1	0,5	3,0	11,6*	2,6	14,7*
22	5,5*	8,8	0,6	3,5*	12,7*	3,5*	16,2*
8	5,4*	9,3	0,6	3,6*	12,9*	3,8*	16,4*
21	5,3*	7,5	0,5	3,3*	10,3	2,9	13,6*
4	5,2	8,0	0,5	3,7*	12,6*	3,3	16,3*
35	5,1	8,7	0,6*	3,9*	13,3*	3,6*	17,2*
23	5,1	9,0	0,4	3,4*	13,3*	2,3	16,6*
30	5,0	7,9	0,6	3,6*	12,3*	3,1	15,9*
3	5,0	9,8	0,6	3,7*	13,1*	3,8*	16,9*
20	5,0	6,7	0,5	3,9*	12,3*	3,4*	16,2*
12	4,9	6,7	0,5	3,4*	12,4*	3,1	15,8*
28	4,9	7,1	0,5	3,7*	12,1	3,2	15,7*
5	4,8	9,0	0,5	3,9*	12,5*	3,8*	16,4*
1	4,8	8,1	0,6*	3,6*	12,1*	3,3*	15,7*
32	4,8	9,8	0,6	3,7*	11,6	3,5*	15,2*
27	4,7	7,1	0,6	3,4*	11,2	3,0	14,6*
18	4,7	8,4	0,5	2,7*	9,8	2,4	12,5
29	4,7	10,9	0,5	3,3*	11,6*	3,5*	15,0*
11	4,6	11,5	0,4	3,4*	10,7	3,6*	14,2
25	4,6	9,2	0,5	3,5*	11,4	3,6*	14,9*
14	4,5	9,1	0,5	3,6*	13,3*	3,6*	16,9*
15	4,5	6,6	0,5	2,9*	9,5	2,7	12,4
6	4,4	8,5	0,4	3,2*	11,7*	3,2	14,9*
9	4,4	10,5	0,5	3,3*	11,5	3,2	14,7*
38	4,4	6,2	0,5	2,5	10,1	2,5	12,5
19	4,4	7,5	0,5	3,6*	11,7*	3,1	15,2*
31	4,3	8,1	0,5	3,4*	11,0	3,4*	14,3
24	4,3	11,4	0,5	3,5*	12,0*	3,6*	15,5*
16	4,3	9,1	0,4	3,1*	10,6	2,9	13,7
2	4,2	7,9	0,4	3,6*	11,4	3,4*	14,9*
17	4,2	9,8	0,5	3,2*	10,5	2,9	13,8
33	4,2	9,0	0,5	3,6*	12,7*	3,4*	16,2*
10	4,1	7,2	0,4	3,3*	11,2	3,7*	14,5*
36	3,8	7,9	0,5	3,2*	11,1	2,8	14,3

\*Significativo a 5% de probabilidade

Quando analisadas em relação à cultivar TAIM, ainda na dose de 9 mM (Tabela 9) observou-se famílias com diferença estatística apenas na variável IPF, na qual constataram-se 9 famílias. O desempenho relativo (d.r.) apresentado (Tabela 9) refere-se àquele obtido em comparação com a média obtida pela família no tratamento controle. Todas as variáveis tiveram famílias que apresentaram desempenho relativo superior a 100%.

Cabe ressaltar que a família 6 apresentou um dos melhores desempenhos relativos, estando sempre entre os três maiores valores, em 6 das 7 variáveis avaliadas (NR, CC, IPF, CPF, CSF e CPA), tendo os maiores valores em 4 destas (IPF, CPF, CSF e CPA) destacando-se como uma família importante na continuação dos estudos em relação a tolerância ao ferro.

Contudo, as famílias 4 e 7 também se destacaram por terem estado entre os três maiores valores de desempenho relativo em 4 dos 7 caracteres avaliados (IPF, CPF, CSF e CPA; CC, IPF, CPF e CPA, respectivamente). A família 26 esteve entre três maiores valores de desempenho relativo em 3 dos 7 caracteres avaliados (NR, CRP e CC).

Tabela 9. Análise de comparação de médias pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro e cálculo do Desempenho Relativo (dr%) das famílias em relação à cultivar TAIM na dose de 9 mM de ferro.

NR		CRP			CC			IPF			CPF			CSF			CPA			
Gen	Média	d.r.(%)	Gen	Média	d.r.(%)	Gen	Média	d.r.(%)	Gen	Média	d.r.(%)									
<b>38</b>	<b>4,4</b>	<b>83,01</b>	<b>38</b>	<b>6,2</b>	<b>101,63</b>	<b>38</b>	<b>0,5</b>	<b>100,00</b>	<b>38</b>	<b>2,5</b>	<b>86,21</b>	<b>38</b>	<b>10,1</b>	<b>86,32</b>	<b>38</b>	<b>2,5</b>	<b>83,33</b>	<b>38</b>	<b>12,5</b>	<b>85,03</b>
26	5,8	<b>187,09</b>	11	11,5	87,12	35	0,6	120,00	5	3,9*	102,63	35	13,3	103,90	8	3,8	108,57	35	17,2	101,78
13	5,8	73,42	24	11,4	53,52	1	0,6	100,00	35	3,9*	95,12	14	13,3	97,08	5	3,8	118,75	14	16,9	95,48
7	5,8	138,09	13	11,1	<b>154,17</b>	13	0,6	85,71	20	3,9*	84,78	23	13,3	115,65	3	3,8	100,00	3	16,9	92,86
34	5,8	116,00	29	10,9	99,09	7	0,6	<b>150,00</b>	34	3,8*	111,76	3	13,1	93,57	10	3,7	100,00	23	16,6	115,28
22	5,5	114,58	9	10,5	92,11	32	0,6	120,00	3	3,7*	90,24	8	12,9	106,61	14	3,6	105,88	8	16,4	103,14
8	5,4	79,41	17	9,8	83,76	8	0,6	100,00	4	3,7*	<b>176,19</b>	22	12,7	91,36	11	3,6	93,50	5	16,4	93,18
21	5,3	139,47	32	9,8	90,74	30	0,6	120,00	28	3,7*	119,35	33	12,7	95,48	24	3,6	92,30	4	16,3	<b>155,23</b>
4	5,2	94,55	3	9,8	70,50	3	0,6	100,00	32	3,7*	97,36	4	12,6	<b>150,00</b>	25	3,6	112,50	22	16,2	89,50
23	5,1	<b>145,71</b>	8	9,3	75,61	22	0,6	100,00	13	3,6*	97,29	5	12,5	91,24	35	3,6	92,31	33	16,2	91,53
35	5,1	110,87	25	9,2	109,52	27	0,6	120,00	14	3,6*	90,00	12	12,4	116,98	29	3,5	100,00	20	16,2	84,37
3	5,0	62,50	7	9,2	93,87	34	0,6	100,00	1	3,6	112,50	30	12,3	90,44	32	3,5	97,22	34	16,0	104,58
20	5,0	76,92	16	9,1	73,98	4	0,5	111,11	30	3,6	92,30	20	12,3	84,82	22	3,5	85,36	30	15,9	90,85
30	5,0	113,64	14	9,1	58,71	26	0,5	<b>166,67</b>	8	3,6	92,29	7	12,3	<b>139,77</b>	33	3,4	85,00	12	15,8	116,17
28	4,9	128,95	23	9,0	105,88	28	0,5	125,00	19	3,6	81,80	34	12,2	102,52	31	3,4	94,44	28	15,7	113,77
12	4,9	92,45	5	9,0	70,31	20	0,5	62,50	2	3,6	100,00	28	12,1	113,08	2	3,4	106,25	1	15,7	112,90
1	4,8	76,19	33	9,0	88,23	21	0,5	100,00	33	3,6	81,81	1	12,1	114,15	34	3,4	97,14	7	15,7	<b>144,04</b>
32	4,8	106,66	22	8,8	100,00	24	0,5	100,00	22	3,5	83,33	24	12,0	93,02	20	3,4	82,92	24	15,5	94,51
5	4,8	58,54	35	8,7	81,31	9	0,5	86,20	25	3,5	102,94	19	11,7	92,12	1	3,3	126,92	19	15,2	89,94
18	4,7	60,26	6	8,5	121,43	12	0,5	11,90	24	3,5	100,00	6	11,7	<b>180,00</b>	13	3,3	94,28	32	15,2	94,41
29	4,7	109,30	18	8,4	56,00	17	0,5	71,42	7	3,4	<b>161,90</b>	29	11,6	110,47	7	3,3	137,50	29	15,0	109,49
27	4,7	106,81	31	8,1	77,88	25	0,5	125,00	11	3,4	84,47	26	11,6	138,09	4	3,3	<b>183,33</b>	2	14,9	96,75
25	4,6	127,77	1	8,1	94,19	14	0,5	100,00	12	3,4	113,33	32	11,6	94,30	6	3,2	<b>213,33</b>	6	14,9	<b>177,38</b>
11	4,6	75,41	26	8,1	<b>147,11</b>	29	0,5	100,00	23	3,4	117,24	9	11,5	82,73	9	3,2	110,34	25	14,9	100,67
14	4,5	67,16	4	8,0	109,59	31	0,5	83,33	31	3,4	91,89	2	11,4	96,61	28	3,2	128,00	9	14,7	82,12
15	4,5	67,16	30	7,9	73,85	15	0,5	62,50	27	3,4	103,03	25	11,4	100,88	30	3,1	83,78	13	14,7	93,03
19	4,4	60,27	36	7,9	79,79	19	0,5	71,43	21	3,3	94,28	10	11,2	80,00	19	3,1	88,57	26	14,7	138,68
6	4,4	<b>146,66</b>	2	7,9	68,10	5	0,5	74,62	29	3,3	103,12	27	11,2	107,69	12	3,1	110,71	27	14,6	106,57
9	4,4	68,75	21	7,5	73,52	36	0,5	83,33	10	3,3	75,00	36	11,1	95,69	27	3,0	88,23	10	14,5	78,80
16	4,3	67,19	19	7,5	59,05	18	0,5	83,33	9	3,3	82,50	13	11,0	90,90	21	2,9	107,40	31	14,3	97,27
24	4,3	130,30	10	7,2	64,28	33	0,5	83,33	6	3,2	<b>177,77</b>	31	11,0	110,91	16	2,9	80,55	36	14,3	94,08
31	4,3	97,72	27	7,1	84,52	23	0,4	100,00	17	3,2	86,48	11	10,7	81,06	17	2,9	87,87	11	14,2	83,53
17	4,2	61,76	28	7,1	107,57	10	0,4	66,67	36	3,2	88,89	16	10,6	80,30	36	2,8	116,67	17	13,8	75,41
33	4,2	87,50	37	7,1	78,89	6	0,4	<b>133,33</b>	16	3,1	79,49	17	10,5	71,91	15	2,7	77,14	16	13,7	80,11
2	4,2	61,76	20	6,7	59,29	11	0,4	67,79	26	3,0	142,85	21	10,3	91,96	26	2,6	<b>173,33</b>	21	13,6	91,89
10	4,1	67,21	12	6,7	<b>155,81</b>	16	0,4	57,14	15	2,9	72,50	18	9,8	69,50	18	2,4	66,67	18	12,5	69,83
36	3,8	92,68	15	6,6	47,80	2	0,4	57,14	18	2,7	71,05	15	9,5	64,18	23	2,3	104,54	15	12,4	65,95
37	1,9	67,85	34	5,6	66,67	37	0,3	60,00	37	1,4	73,68	37	5,4	78,26	37	1,5	83,33	37	6,9	78,41

\* Significativo a 5% de probabilidade.

## Biologia Molecular

### *Análise de Agrupamento*

Da análise de AFLP utilizando as 9 combinações de *primers* foi obtido um total de 206 marcadores, 184 (89,32%) foram polimórficos entre as famílias estudadas e, 22 (10,68%) foram monomórficos. O número de marcadores polimórficos variou de um máximo de 30 para a combinação de *primer* M-CAC; E-AAC até um mínimo de 10 para a combinação M-CTG; E-AGG (Tabela 10).

O baixo número de bandas monomórficas evidencia o grande potencial da técnica de AFLP em detectar a variabilidade genética presente nestas famílias de arroz e a alta influência da mutação na criação de variabilidade entre as famílias.

Tabela 10. Relação das 9 Combinações de *primers* utilizadas na análise de AFLP e número de bandas polimórficas obtidas.

Combinação de <i>primers</i>	Número de bandas Polimórficas
M-CAA; E-AGG	18
M-CTA; E-ACA	22
M-CAC; E-AAC	30
M-CAG; E-ACC	15
M-CAT; E-AGC	24
M-CTG; E-ACT	25
M-CAA; E-AAC	26
M-CAA; E-AGC	16
M-CTG; E-AGG	10
TOTAL	186

O valor da matriz cofenética ( $r$ ) (Rohlf & Sokal, 1962), obtida da comparação das matrizes de dissimilaridade e do dendrograma foi de 0,67. Esse valor considera-se representativo e reflete a precisão do dendrograma na representação gráfica dos dados de dissimilaridade entre as famílias. O valor do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,45, indicando assim que 55% da variação é aleatória.

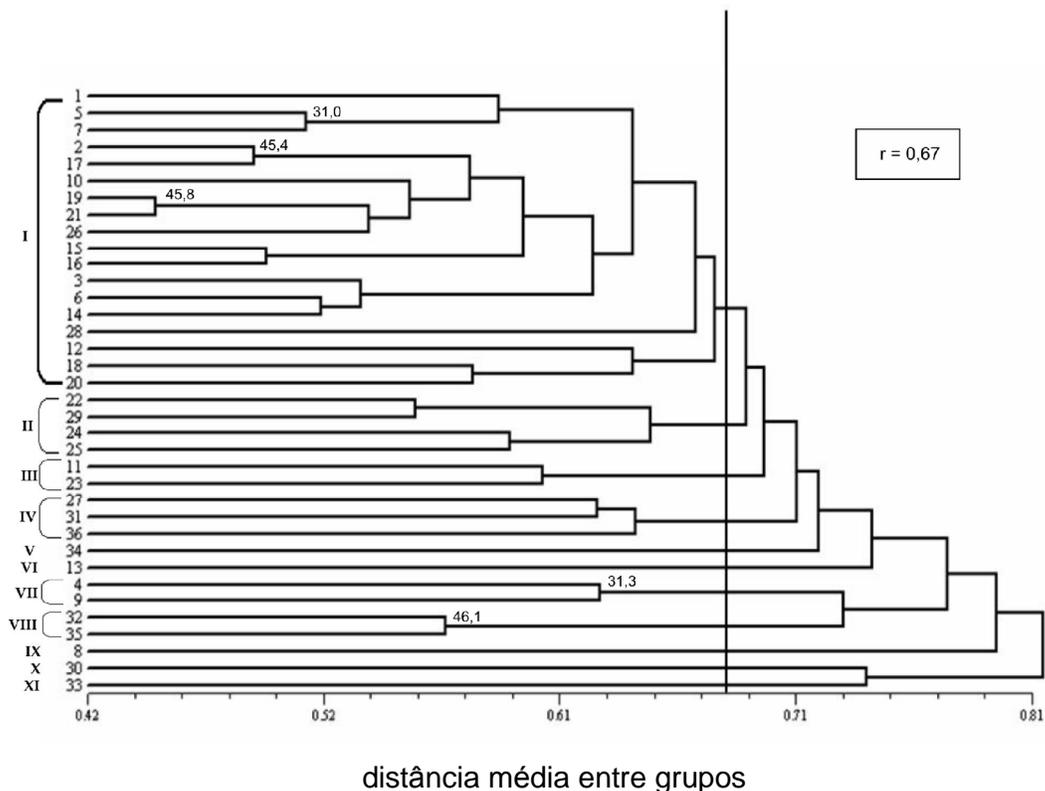


Figura 1: Dendrograma das 35 famílias mutantes e da cultivar TAIM (36), obtido a partir da análise de AFLP utilizando o índice de similaridade de Dice (1945) e o método de agrupamento UPGMA. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 1000 ciclos de análise de *bootstrapping* utilizando o programa Winboot. O ponto de corte foi de 0,68. FAEM/UFPEL, Pelotas, 2006.

Baseado no valor médio das distâncias genéticas (0,68) pode-se visualizar a formação de onze grupos: um principal, cinco menores e cinco formados por apenas uma família. O grupo maior inclui 18 famílias (1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 26, 28), representando 50% (Grupo I – Figura 1). O segundo grupo apresentou quatro famílias, sendo elas 22, 24, 25 e 29 (Grupo II, Figura 1). Um terceiro grupo apresentou as famílias 27, 31 e 36 (Grupo IV – Figura 1), enquanto três outros grupos, Grupo III, VII e VIII apresentaram duas famílias cada, 11 e 23, 4 e 9, 32 e 35, respectivamente. Os demais blocos não apresentaram agrupamento distinto, sendo que cinco grupos são representados por apenas uma família (V, VI, IX, X e XI),

evidenciando a grande dissimilaridade apresentada por estas em relação às demais famílias utilizadas na análise.

Apenas cinco grupos evidenciaram valores percentuais de agrupamento coincidentes acima de 30% após 1000 ciclos de *bootstrapping*, sendo eles representados pelas famílias: 35 e 32 (46,1%), 21 e 19 (45,8%); 2 e 17 (45,4%); 4 e 9 (31,3%) e 5 e 7 (31,0%) revelando que tais agrupamentos são os mais consistentes (Figura 1).

Com base nos valores de distância genética média, dentre as 35 famílias caracterizadas molecularmente, as que apresentaram a maior similaridade foram a 19 (CGF-Z-M05-280) e 21 (CGF-Z-M05-26OP) (Figura 1), com uma distância de 0,448. As mais distantes foram a 9 (CGF-Z-M05-79) e 36 (TAIM), com uma distância de 0,947 entre si. A família que se apresentou mais próxima da cultivar TAIM foi a 21 (CGF-Z-M05-260 P1), com uma distância de 0,56.

#### *Análise de frequência alélica dos marcadores moleculares*

Do total de marcadores avaliados (186), dois obtiveram a maior frequência de presença (0,67), sendo que estiveram presentes em 24 dos 36 genótipos avaliados, e a menor frequência foi observada em 13 dos 36 genótipos avaliados (0,36), os quais se apresentaram como cópia única nas famílias 9, 12, 13, 15, 16, 18, 17, 20, 22, 23, 25, 27 e 28. Dentre as que apresentaram alelos únicos, as famílias 13, 20 e 28 diferiram estatisticamente da cultivar TAIM quando avaliadas na dose de 9 mM, estando entre as 10 maiores médias da variável IPF.

## CONCLUSÕES

### Hidroponia

- A mutação permitiu o incremento da variabilidade para o caráter em estudo.
- A variável que melhor discriminou as famílias estudadas foi IPF.
- A família 6 (CGF-Z-M05-188) comportou-se com média baixa nas sete variáveis do tratamento controle, porém apresentou médias superiores às testemunhas em 6 das 7 variáveis (NR, CRP, IPF, CPF, CSF e CPA) no tratamento com 9 mM de ferro. Quando submetida ao estresse, obteve desempenho relativo superior, mesmo comparada às três testemunhas em todas as variáveis analisadas.
- As famílias 4 (CGF-Z-M05-243), 7 (CGF-Z-M05-42) e 26 (CGF-Z-M05-192) também foram favorecidas pela mutação, apresentando médias superiores nas variáveis IPF, CPF, CSF e CPA; CC, IPF, CPF e CPA; NR, CRP e CC, respectivamente, em relação à cultivar TAIM na dose de 9 mM.

## **Biologia Molecular**

- A técnica de AFLP mostrou-se eficiente no estudo de dissimilaridade entre as diferentes famílias mutantes.
- As famílias 19 (CGF-Z-M05-280) e 21 (CGF-Z-M05-260 P1) resultaram ser as mais próximas na análise de agrupamento baseado em dados de marcadores moleculares.
- A mutação aumenta consideravelmente a variabilidade da cultivar.

## BIBLIOGRAFIA

AHNSTRÖM, G. Radiology. In: IAEA. **Manual on Mutation Breeding**. 2nd ed., Vienna, 288p., p.21-28 (Technical Reports Series, 119), 1977.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Mol. Biol. Rep.** v.9, pp.208-218, 1991.

AZAMBUJA, I.H.V.; FAGUNDES, P.R.; MAGALHÃES Jr., A.M. Importância sócio-econômica da lavoura de arroz irrigado. In: MAGALHÃES Jr., A.M; FAGUNDES, P.R.R. (Coords.) **Agricultura real: arroz irrigado**. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, p.7-8. (EMBRAPA-CPACT. Documentos, 20), 1996.

BACHA, R.E. Avaliação de linhagens e cultivares de arroz irrigado para condições adversas de solo: toxidez por ferro. In: Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 19.,1991, Balneário Camburiú. **Anais**. Florianópolis: EMPASC, 1991.p.156-159.

BALLA, G.; JACOB, H.S.; BALLA, J.; ROSENBERG, M.; NATH, K.; APPLE, F.; EATON, J.W.; VERCELLOTTI, G.M. Ferritin: a cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium. **J Biol Chem** 267, 18148-18153, 1992.

BARBOSA FILHO, M.P. **Nutrição e adubação do arroz (sequeiro e irrigado)**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, 1987.129p.(Boletim Técnico,9).

BARBOSA FILHO, M.P.; DYNIA, J.F.; FAGERIA, N.K. **Zinco e ferro na cultura do arroz**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.71p.

BATAGLIA, O.C. Ferro. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. da (Eds). **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: POTAFOS/CNPq, 1991. p.159-172.

BIENFAIT, H.F. Regulated redox process at the plasmalemma of plant root cells and their function on iron uptake. **J. Bioenerg Biomembr** 17, 73-83, 1985.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3ed., Editora Universidade Federal de Viçosa, 2001.

BORLAUG, N.E. Contribution of Conventional Plant Breeding to Food Production. **Science**, v.219, pp.689-693, February, 1983.

BOUZAYEN, M.; FELIX, G.; LATCHÉ, A.; PECH, J.C.; BOLLER, T. Iron: an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. **Planta** 184, 244-247, 1991.

BRENNAN, EW; LINDSAY, WL. Reduction and oxidation effect on the solubility and transformation of iron oxides. **Soil Science Society of America Journal**, Vol 62, Issue 4 930-937, 1998.

BREWBAKER, J.L. **Genética na Agricultura**. São Paulo, Polígono, Editora da Universidade de São Paulo, 224p., 1969.

BRIARD, M., CLERA, V.L.E., GNZEBELUS, D., SENALIK, D AND SIMON, P.W. Modified Protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLPTM analysis using silver stain on radioisotopes. **Plant Molecular Biology Reporter** 18: 235 . 241, 2000.

BRIAT, J. et al. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biot Cell** 84, 69-81, 1995.

BRIAT, J.; LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science Reviews**. 1997, Vol.2, N°5.

BRIGGS, R.W.; CONSTANTIN, M.J. Radiation types and radiation sources. In: IAEA. **Manual on Mutation Breeding**. New York, Reinhold Publishing, 426p., 1977.

BROWN, C.J.; AMBLER, J.E.; CHANEY, R.L.; FOY, C.D. Differential responses of plant genotypes to micronutrients. In: MORTVEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L. (Eds). **Micronutrients in agriculture**. Madison: Soil Science Society of America, 1972.p.389-418.

CAMARGO, C.E., OLIVEIRA, O.F, Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, Campinas, v.40, n.3, p.21-31, 1981.

CHANEY,R.L.; BROWN,J.C.; TIFFIN,L.O. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. **Plant Physiology**,Lancaster,v.50,p.208-213,1972.

CHANG, T. T. Rice. In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. London, Longmans, 1974, p. 98-104.

CLARK, R.B.; Plant genotype differences in the uptake, translocation, accumulation and use of mineral elements required for plant growth. **Plant and Soil**, The Hague, 49-70, 1983.

COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; SILVA, J.A.G.; LORENCETTI, C. Comparação entre mutagênicos químico e físico em populações de aveia. **Ciência Rural**, santa Maria, v.35, n.1, p.46-55, jan-fev, 2005.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária, p.390, 1997.

DEVOS, K.M.; GALE, M.D. Genome Relationships: The Grass Model in Current Research. **Plant Cell**, v.12, p.637-646, 2000.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, Washington, v.26, n.3, p.297-307, 1945.

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R.J. An introduction to the bootstrap. Chapman and Hall, New York, 436p, 1993.

FAGERIA, N.K.; BARBOSA FILHO, M.P.; CARVALHO, J.R.P.; RANGEL, P.H.N.; CUTRIN, V.A. Avaliação preliminar de cultivares de arroz para tolerância à toxidez de ferro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, p.1271-1278, 1984.

FAGERIA, N.K.; RABELO, N.A. Tolerance of rice cultivars to iron toxicity. **J Plant Nutr** 10, 653-661, 1987.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J. Iron nutrition of plants: an overview on the chemistry and physiology of its deficiency and toxicity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, p.533-570, 1990.

FANG, W.; KAO, C.H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science** 158, 71-76, 2000.

FRARY, A.; NESBITT, T.C.; FRARY, A.; GRANDILLO, S.; VAN DER KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K.B.; TANKSLEY, S.D. *fw2.2*: A quantitative trait *locus* key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, v.289, pp.85-88, 2000.

FURLANI, A.M.C; BATAGLIA, O.C.; AZZINI, L.E. Variabilidade entre linhagens de arroz na absorção e utilização de potássio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 1986, 10: 135-41.

GAUL, H. Mutations in plant breeding. **Radiation Botany**, Great Britain, v.4, p.155-232, 1964.

GOFF, S.A.; RICKE, D.; LAN, T-H et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). **Science**, v.296, n.5565, pp. 92-100, 2002.

GUIMARÃES, E.P.; ANDO, A. Efeitos da duplicação dos mutagênicos azida sódica e radiação gama em sementes de arroz. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.32, n.5, p.619-622, 1980.

HELSOT, H. Chemical mutagens: mode of action. In: IAEA. **Manual on Mutation Breeding**. 2nd ed., Vienna, 288p., p.51-78 (Technical Reports Series, 119), 1977.

HOWLAND, G. P.; HART, R. W. **Radiation biology of culture plant cells**. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. p. 161-167, Berlim, 1977.

IRRI. **The International Rice Research Institute Library**. Disponível em: <http://ricelib.irri.cgiar.org/>. Acesso em: 20 de outubro de 2005.

KAMPF, N. O ferro no solo. In: Reunião sobre ferro em solos inundados, 1., 1987, Goiânia. **Anais**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF; 1988. p.35-714.

KOEBNER, R.M.D., DEVOS, K.M., GALE, M.D., **Advances in the Application of Genetic Markers In Plant Breeding**. Cereals Research Department JI Centre, U.K.1994.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 434p.

LINDSAY, W.L.; SCHWAB, A.P. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.5,p.324-340,1982.

LIU, B.H. **Statistical Genomics – Linkage, Mapping and QTL Analysis**. CRC – Boca Raton, New York, 611p, 1998.

MAC KEY, J.; QUALSET, C.O. Conventional methods of wheat breeding. In: E. L. Smith. **Genetics improvement of yield of wheat**. Madison, CSSA, p.7-23. 1986.

MACLEAN, J. L.; DAWE, D. C.; HARDY, B.; HETTEL, G. P. **Rice Almanac**. Third Edition, IRRI, 2002.

MALONE, G; ZIMMER P.D. MARCADORES MOLECULARES. IN: ZIMMER, P.D, OLIVEIRA. A.C. E MALONE, G. **FERRAMENTAS DA BIOTECNOLOGIA (ORG)**. ED. UNIVERSITÁRIA, P.77- 114, 2005.

MALUSZYNSKI, M. Crop Germplasm enhancement through mutation techniques. In: **Proceedings of the International Symposium on Rice Germplasm Evaluation and Enhancement**. *J.N. Rutger, J.F. Robinson and R.H. Dilday, editors*. Arkansas, USA. August 30 – September 2, 1998.

MARTINS, A.F.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; PEREIRA, R.; VIEIRA, E.A.; KOPP, M.M.; CARVALHO, M.F.; MAIA, L. Caracterização de famílias de mutantes de arroz da cultivar BRS-7 para tolerância ao frio nos períodos germinativo, vegetativo e reprodutivo. **IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**, Santa Maria/RS, 2005.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition 3<sup>rd</sup> ed. Switzerland, **International Potash Institute**. 1982. 655p.

MOORE, G.; GALE, M.D.; KURATA, N.; FLAVELL, R.B. Molecular analysis of small grain cereal genomes: Current status prospects. **Biotechnology**, v.11:pp.584-589, 1993.

OH, S-H; CHO, S-W; KWON, T-H; YANG, M-S. Purification and characterization of phytoferritin. **J. Biochem. Mol. Biol.** 29: 540-544. 1996.

OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; ZIMMER, P.D.; MATTOS, L.A.T. The Brazilian Rice Genome Initiative – BRIGI. In: International Rice Genome Meeting, 2002, Tsukuba. **International Rice Genome Meeting**. pp.12, 2002.

PANDINI, F.; CARVALHO, F.I.F.; BARBOSA NETO, J.F. Plant height reduction in populations of triticale (*X triticosecale* Wittmack) by induced mutations and artificial crosses. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, n.3, pp.483-488, 1997.

PENG, X.X.; YAMAUCHI, M. Ethylen production in rice bronzing leaves induced by ferrous iron, **Plant Soil** 149, p.227-234, 1993.

PENG, X.X.; YU, X.L.; LI, M.Q.; YAMAUCHI, M. Induction of peroxidase by Fe<sup>+2</sup> in detached rice leaves, **Plant Soil** 180, p.159-163, 1996.

POEHLMAN, J.N. **Mejoramiento Genetico de las Cosechas**. Ed. Limusa-Wiley, S.A. Mexico, 1965.

POEHLMAN, J.M. **Breeding field crops**. 3ed. Westport, Avi. Publ., 486p., 1986.

PONNAMPERUMA, F.N.; BRADFIELD, R.; PEECH, M. Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. **Nature**, 175, 275, 1955.

PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.64, p.185-210, 2001.

PRZYBYLA, A. Mutagenesis en fitomejoramiento de plantas de propagación vegetativa. **Revista Chapingo**, México, v.1, p.145-150, 1994.

ROHLF F.J and R.R SOKAL. Comparing numerical taxonomic studies. **Systematic zool.**, 30: 459-490, 1981.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.

SAMBROOK; MANIATIS & FRITSCH. **A laboratory Manual**. Second edition, 1989.

SANTOS FILHO, D.G. dos. Ferro na planta. In: Reunião Sobre Ferro em Solos Inundado; 1.,1987,Goiânia.**Anais**.Goiânia:EMBRAPA-CNPAF,1988.p.72-93.

SIEDOW, J.N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 42, 145-188, 1991.

SIEVERS, R.E.; BAILAR, J.C.,Jr. Some metal chelates of ethylenediaminetetraacetic acid, diethylenetriaminepentaacetic acid and triethylenetriaminehexaacetic acid. **Inorganic Chem.** 1: 174-182, 1962.

SIGURBJORNSSON, B. Introduction: Mutations in plant-programmes. In: IAEA. **Manual on Mutation Breeding**. 2<sup>nd</sup> ed. Vienna, IAEA. p,288. p.1-6 (Technical Reports, 119), 1977.

SILLANPÄÄ, M.; OIKARI, A. Assessing the impact of complexation by EDTA and DTPA on heavy metal toxicity using microtox bioassay. **Chemosphere**, Vol.32, No.8, pp. 1485-1497, 1996.

SILVA, M.M.; VALE, M.G.; DAMIN, A.C.F.; WELZ, B.; MANDAJI, M.; FETT, J.P. Method development for the determination of iron milligram amounts of rice plants (*Oryza sativa* L.) from cultivation experiments using graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Anal Bioanal Chem** 377: 165-172, 2003.

SILVA, Manuel Vianna e. **A Cultura do Arroz**. Coleção técnica agrária. Clássica Editora. 1975. 171p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

SOUSA, R.O. **Alternativas tecnológicas que visam minimizar o efeito da toxidez por Ferro em arroz irrigado (*Oryza sativa* L.)**. Universidade Federal de Pelotas (Dissertação de Mestrado), 1991.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

USDA. **Rice Situation and Outlook Yearbook**. Market and Trade Economics Division, Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture, November, 2004.

VAHL, L.C. **Toxidez de Ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento**. Universidade Federal de Pelotas (Tese de Doutorado), Porto Alegre, 1991.

VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 633p.

VOS, P.; HOGRES, R.; BLEEKER, M; REIJANS, M; LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for ADN fingerprinting. **Nucl. Ac. Res.**, 23(21):4407-4414, 1995.

WU, P. et al. Characterization of tissue tolerance to iron by molecular markers in different lines of rice. **Plant and Soil** 203: 217-226, 1998.

YAP, I.V.; NELSON, R.J. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Manila: **IRRI**, 22p, 1996.

YE, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, v.287, pp.303-305, 2000.

YU, J.; HU, S.; WANG, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). **Science**, v.296, n.5565, pp. 79-92, 2002.

ZIMMER, P. D. **Inferências genéticas em arroz e milho**. Universidade Federal de Pelotas (Tese de Doutorado), 2002.

ZIMMER, P. D.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; MATTOS, L. A. T.; FREITAS, F.; KÖPP, M. M.; FONSECA, F. S.; MARTINS, A. F.; WESTPHAL, M.; FERRI, J. Mutants affecting root traits in rice In. **INTERNATIONAL RICE GENOME MEETING - INTERNATIONAL CONGRESS CENTER, TSUKUBA, 2002.**

ZIMMER, P.D.; MATTOS, L.A.T.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.; KOPP, M.M.; FREITAS, F.A. Identification of rice mutants (*Oryza sativa* L.) for agronomical and root system traits. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.3, p.195-199, 2003.

## ANEXOS

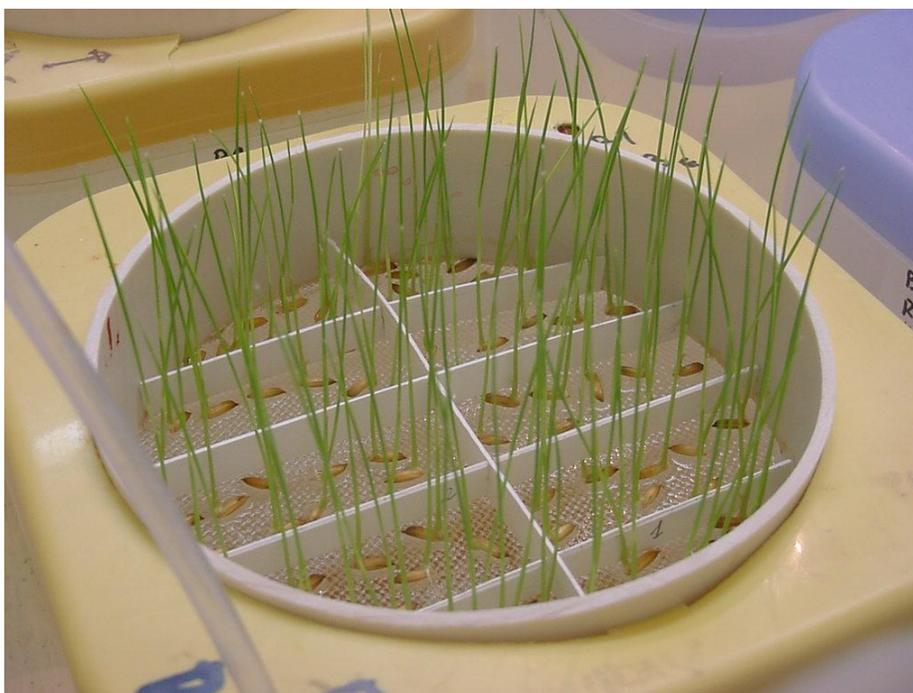


Figura 1: Cultivo hidropônico utilizado no experimento.

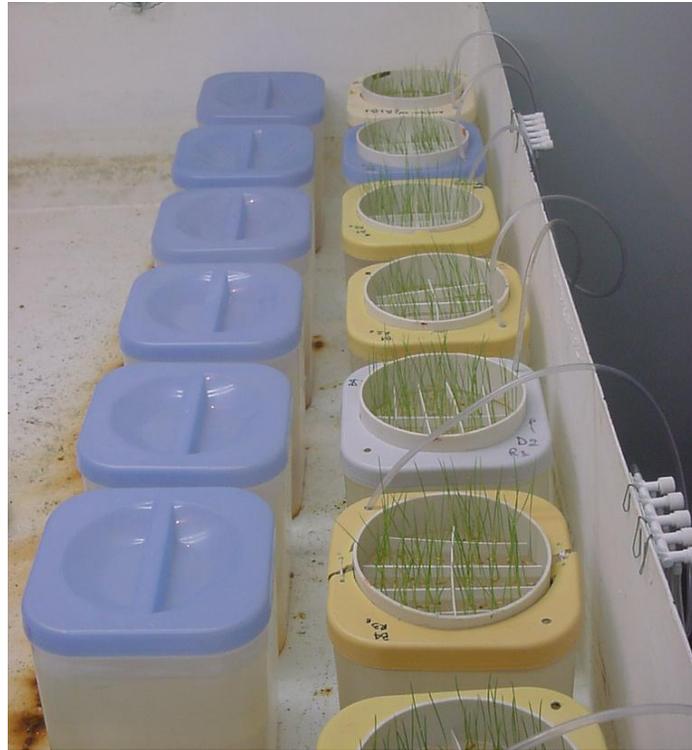


Figura 2: Vista geral do sistema de hidroponia utilizado no experimento.



Figura 3: Disposição em blocos da plantas utilizadas no experimento cultivadas em casa de vegetação.



Figura 4: Disposição em blocos da plantas utilizadas no experimento.