

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Tese

Variabilidade genética de germoplasma de arroz (*Oryza sativa* L.) para tolerância ao frio na germinação

Daisy Leticia Ramírez Monzón

Pelotas, 2015

Daisy Leticia Ramirez Monzón

Variabilidade genética de germoplasma de arroz (*Oryza sativa* L.) para tolerância ao frio na germinação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Dr. Luciano Carlos da Maia – FAEM/UFPeI

Co-orientadores: PhD. Antonio Costa de Oliveira – FAEM/UFPeI

Dr. Ariano Martins de Magalhães Jr. - Embrapa/CPACT

Dra. Caroline Marques Castro- Embrapa/CPACT

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M816v Monzon, Daisy Leticia Ramirez

Variabilidade genética de germoplasma de arroz (Oryza sativa L.) para tolerância ao frio na germinação / Daisy Leticia Ramirez Monzon ; Luciano Carlos da Maia, Ariano Martins de Magalhães Jr., orientadores ; Antonio Costa de Oliveira, Caroline M. Castro, coorientadores. — Pelotas, 2015.

111 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Características fenotípicas. 2. Estresse. 3. SSR. I. Maia, Luciano Carlos da, orient. II. Jr., Ariano Martins de Magalhães, orient. III. Oliveira, Antonio Costa de, coorient. IV. Castro, Caroline M., coorient. V. Título.

CDD : 633.18

Banca Examinadora:

Dr. Luciano Carlos da Maia - FAEM/UFPeI (presidente)

PhD. Antonio Costa de Oliveira - FAEM/UFPeI

Dr. Ariano Martins de Magalhães Jr. - Embrapa /CPACT

Dr. Geri Eduardo Meneghello - - FAEM/UFPeI

DEDICO

Aos amores da minha vida;

As duas pessoas que me deram a primeira educação que sem eles não conseguiria esta vitória, minha mãe e meu pai, obrigada por estar presente em cada momento, em cada vitória, por acalmar meu coração quando precisei e por me levantar quando vacilei, Eu amo vocês!!

A meu esposo Ernesto Bernal, pela paciência, carinho, amor, amizade e dedicação por ser a pessoa que mais me incentiva, meu companheiro em todos os momentos, que tem me apoiado e me ajudado a alcançar os meus objetivos. Todo esse esforço e dedicação não fariam sentido para mim se você não estivesse ao meu lado, tu és o melhor!

À minha avó Odocia Vda de Monzón (*In memori*) e meu avô de coração Olindo José Gini (*In memori*). A distância foi muita para vocês esperarem por mim, mais esta conquista também é dedicada a vocês.

*A mi querido país, por
ser ese bello lugar que me
vio crecer, este pequeño
grano de arena te dedico a
TI mi querido PARAGUAY.*

Ofereço

Meus maiores agradecimientos

Agradeço a Deus pelo dom da vida, a Virgem por ser minha guia e minha luz.

Ao meu orientador Prof. Luciano Carlos da Maia, obrigada pela oportunidade, incentivo, transmissão de conhecimentos, apoio, amizade, além da confiança que colocou em mim.

Ao meu co-orientador Prof. Antonio Costa de Oliveira pela oportunidade, orientação, amizade, boas conversas e ensinamentos transmitidos.

Aos pesquisadores da Embrapa Clima Temperado, Ariano Martins de Magalhães Jr. e Caroline Castro Marques pelo apoio, amizade, colaboração e ajuda durante o experimento, assim como por tornarem meu sonho realidade de formar parte da Embrapa.

Ao meu marido, sobretudo pelo amor, apoio constante, compreensão por minhas ausências e ser meu porto seguro quando precisava de conforto.

Aos meus pais, meus irmãos e minha sobrinha Zaira, pelo carinho e por compreender minhas ausências.

Aos meus sogros, Maria e Porfírio Bernal e à minha querida cunhada Romina pela preocupação e constante apoio, assim por todos os bolos que fizeram para múltiplas viagens.

Aos meus tios Carlos e Norma, por estarem sempre presentes apoiando-me e orando por mim na distância, o que sempre serei grata.

Às minhas amigas Jadyi e Johana, por todo o apoio de sempre, incentivo e pelos bons finais de semana estudando.

Às minhas amigas que levarei sempre no coração, Raquel, Roberta e Tati, obrigada pela ajuda, boas conversas, amizade e sobretudo pela ajuda de todos os dias. Sentirei falta de nossos encontros.

Aos meus amigos e colegas do CGF, Monalize, Robinson, Viviane, Renata, Ariadne, Tatiane, Daniel, Solange, Railson, Mariana, Henrique, Rafael, Rodrigo, Arturh, Eduardo, Daniela, pelos agradáveis momentos de convivência, troca de experiências e ajuda constante, vou sentir falta das nossas conversas.

Às colegas e amigas do Laboratório de Biologia Molecular Embrapa, Raquel, Natércia, Ângela, Naciele, Liane pela ajuda, as boas conversas e a amizade.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica do Laboratório Genômica e Fitomelhoramento pela grande ajuda durante as avaliações e experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/FAEM-UFPeI, pela oportunidade de realização deste sonho hoje feito realidade.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/ CAPES, pela conceição da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa vitória.

À toda grande família que eu fiz nestes cinco anos, muito

Obrigada!

“Um dia aprendi que sonhos existem para tornar-se realidade. E, desde aquele dia, já não durmo para descansar. Simplesmente durmo para sonhar.”

Walt Disney

Resumo

MONZÓN, DAISY LETICIA RAMIREZ. **Variabilidade genética de germoplasma de arroz (*Oryza sativa* L.) para tolerância ao frio na germinação.** 2015. 111f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

No estado do Rio Grande do Sul as temperaturas baixas são um dos principais fatores limitantes à cultura do arroz, sendo a tolerância ao frio uma característica de difícil seleção em condições de campo. A utilização de marcadores moleculares *SSR* combinados com características fenotípicas fornecem informações completas e precisas, permitindo ao melhorista selecionar de maneira mais eficiente genótipos úteis para os programas de melhoramento. Sendo assim, o objetivo foi estudar a variabilidade genética dos genótipos pertencente ao banco ativo do germoplasma do arroz da Embrapa, utilizando caracteres morfológicos e marcadores moleculares *SSR* para a identificação de variabilidade para tolerância ao frio na germinação. A resposta dos genótipos para estresse por frio na germinação foi avaliada em dois experimentos; I: 124 genótipos de arroz e quatro testemunhas tolerantes foram avaliados em condição de temperaturas de 13°C por 28 dias e 25°C por sete dias; foi comparado seu desempenho relativo, medido pelo comprimento do coleótilo, comprimento de raiz, comprimento de parte aérea e germinação. II: sob oscilação de temperatura de: 25°C, durante 72 horas, 13°C por 96 horas (frio) e novamente 25°C por 72 horas (controle) para diferenciar genótipos quanto à tolerância ao frio por meio do recrescimento do coleótilo. Foram avaliados 151 genótipos e nove *locus SSR*. Os resultados obtidos indicaram que entre os genótipos estudados do banco de germoplasma da Embrapa existe ampla variabilidade genética, assim como diferentes respostas ao estresse. Assim, alguns genótipos possuem potencial para serem utilizados na ampliação da base genética em programas de pré-melhoramento e melhoramento da cultura. Com base na caracterização fenotípica, os genótipos mais promissores para cruzamentos e obtenção de progênies superiores quanto à tolerância ao frio são BRS 7-Taim, Rio Grande, EEA 405. Na caracterização genotípica, os genótipos em estudo apresentaram grande variabilidade genética.

Palavras-chave: Características fenotípicas; Estresse; *SSR*.

Abstract

MONZÓN, DAISY LETICIA RAMIREZ. **Genetic variability in the rice (*Oryza sativa* L.) germoplasm of Embrapa using molecular and morphological markers.** 2015. 111f. Thesis (Doctor of Sciences) – Programa de Pós Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.

At the Rio Grande do Sul State low temperatures are one of the main limiting of rice crop, being the cold tolerance a characteristic of difficult selection on field conditions. The utilization of *SSR* molecular markers combined with phenotypic characteristics provides complete and precise information, enabling the breeder to select more efficiently useful genotypes to the breeding programmes. Therefore, the aim of this work was to study the genetic variability of the genotypes belonging of the rice germoplasm active bank of Embrapa, using morphological characters and *SSR* molecular markers, to identify the genetic variability in cold tolerance at the germination. The response of the genotypes to cold stress during the germination was evaluated in two experiments; I: 124 rice genotypes and four tolerant controls were evaluated on conditions of temperature of 13 °C during 28 days and 25 °C during seven days; there were compared their relative performance, measured by the length of the coleoptile, root and shoot, and germination. II: under oscillation of temperature of 25 °C during 72 hours, 13 °C during 96 hours (cold) and again 25 °C during 72 hours (control) to differentiate the genotypes in terms of cold tolerance by the regrowth of the coleoptiles. There were evaluated 151 genotypes and nine *SSR loci*. The results obtained indicated that among the studied genotypes of the germoplasm bank of Embrapa, there are broad genetic variability, as well as different stress responses. Then, some genotypes have the potencial to be used in the expansion of the genetic basis in the pre-breeding and breeding programmes of this crop. Based on the phenotypic characterization, the most promising genotypes to cross and obtain superior progenies in terms of cold tolerance were BRS 7-Taim, Rio Grande and EEA 405. In the genotypic characterization, the genotypes in study showed high genetic variability.

Keywords: Tolerance, Stress, Cold, *SSR*.

Lista de Figuras

Capítulo II. Caracterização fenotípica de genótipos de arroz para tolerância ao frio no estágio germinativo

- Figura 1** Distribuição de 124 genótipos de arroz com quatro genótipos (testemunhas) identificados pelos escores dos genótipos para as duas primeiras variáveis canônicas (VC1 e VC2), cada cor representa um grupo diferentes, preto (genótipos desconhecidos), vermelho (*indica*), verde (*japonica temperado*) e turquesa (*japonica tropical*). Embrapa/ CGF/UFPel, Pelotas-RS, 2015 57

Capítulo III. Avaliação da variabilidade genética em germoplasma de arroz utilizando marcadores moleculares SSR

- Figura 1** Análise de correspondência múltipla (ACM) dos 154 genótipos de arroz a partir de nove *loci* SSR, os grupos foram indicados como vermelho (*indica*), verde (*japonica temperado*), turquesa (*japonica tropical*) e preto (genótipos desconhecidos). Embrapa/CGF/ UFPel, 2015 74
- Figura 2** Média dos valores de ΔK de Evanno et al. (2005) para duas repetições de simulações no programa Structure com $k = 1$ a 10 para 151 genótipos de arroz. Embrapa/CGF/ UFPel, 2015.....78
- Figura 3** Alocação de 151 genótipos de arroz em grupos identificados na análise da estrutura do germoplasma usando o programa Structure para: a) $k=2$, acessos identificados com azul= *indica*, em laranja= *japonica*. b) $k=5$, cada cor representa uma diferente subgrupo azul= *indica*, em laranja= mistura de *indica* e *japonica temperado*, em roxo=*japonica tropical* em verde=*japonica temperado*, e lilás=som não classificados. Embrapa/CGF/ UFPel, 2015.....80

Lista de Tabelas

Capítulo II. Caracterização fenotípica de genótipos de arroz para tolerância ao frio no estágio germinativo

Tabela 1	Resumo da análise de variância do desempenho relativo dos caracteres comprimento de coleóptilo (DRcc), comprimento de raiz (DRcr), comprimento de parte aérea (DRcpa) e germinação (DRgrm) avaliados em seis genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....	40
Tabela 2	Desempenho relativo (DR) das variáveis comprimento de coleóptilo (DRcc), comprimento de raiz (DRcr), comprimento de parte aérea (DRcpa) e germinação (DRgrm) das testemunhas utilizadas. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....	41
Tabela 3	Resumo da análise de variância do desempenho relativo dos caracteres comprimento de coleóptilo (DRcc), comprimento de raiz (DRcr), comprimento de parte aérea (DRcpa) e germinação (DRgrm) avaliados em 124 genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....	41
Tabela 4	Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do Desempenho relativo do comprimento de coleóptilo (DRcc), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....	42
Tabela 5	Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz, agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do Desempenho relativo do comprimento da raiz (DRcr), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....	45
Tabela 6	Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz, agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do Desempenho relativo do comprimento da parte aérea (DRcpa), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....	48
Tabela 7	Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz, agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável	

do Desempenho relativo na germinação (DR_{grm}), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....50

Tabela 8	Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando as distâncias de Mahalanobis geradas a partir do DR das quatro variáveis avaliadas nos 124 genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....52
Tabela 9	Coeficiente de correlação de Pearson do Desempenho relativo (DR) entre as três variáveis: comprimento do coleóptilo, comprimento da raiz e comprimento da parte aérea, analisados dos 124 genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....53
Tabela 10	Autovalores, percentuais e acumulação das variáveis canônicas obtidas de 124 genótipos de arroz, submetido ao estresse por frio. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....54
Tabela 11	Resumo da análise de variância do desempenho relativo dos caracteres recrescimento do coleóptilo (RCOL), avaliados em 124 genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....57
Tabela 12	Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz, agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do recrescimento do coleóptilo (RCOL), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.....58

Capítulo III. Avaliação da variabilidade genética em germoplasma de arroz utilizando marcadores moleculares SSR

Tabela 1	Descrição dos nove <i>locus</i> SSR utilizados na genotipagem dos 151 genótipos de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.). Embrapa Clima Temperado, UFPel/CGF/Pelotas, 2015.....66
Tabela 2	Tamanho de alelo (TA) e número de genótipos (Nº G) observados nos 151 genótipos analisados, para os nove <i>loci</i> SSR. Embrapa Clima Temperado, UFPel/CGF/Pelotas, 2015.....70
Tabela 3	Análise molecular da variância (AMOVA) baseada em nove SSR para 151 genótipos de <i>Oryza sativa</i> L. avaliados quanto à estrutura genética. Embrapa/CGF/ UFPel, 2015.....

Sumário

Resumo	8
Abstract	9
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	11
1. Introdução geral	14
1.2 Referências bibliográficas	17
2. Capítulo I. Revisão bibliográfica	
2.1 Importância da conservação do recurso genético no arroz.....	21
2.2 Caracterização morfológica em arroz	22
2.3 Caracterização molecular	23
2.4 Resposta ao frio em genótipos de arroz	25
2.5 Importância da variabilidade e base genética na cultura do arroz	28
2.6 Genealogia das variedades de arroz	30
3. Capítulo II. Caracterização de famílias mutantes do arroz quanto à tolerância ao estresse por baixas temperaturas no estágio germinativo	
3.1 Introdução	32
3.2 Material e métodos	35
3.3 Resultados e discussão	39
3.4 Conclusão	59
4. Capítulo III. Avaliação da variabilidade genética em germoplasma de arroz utilizando marcadores moleculares (SSR)	
4.1 Introdução	60
4.2 Material e métodos	64
4.3 Resultados e discussão	68
4.4 Conclusão	81
5. Referências bibliográficas.....	82
Apêndices	100
VITA	111

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo considerado o alimento básico mais importante para aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas (IRRI, 2014). No Brasil esta cultura corresponde a 6,12% da produção de grãos, sendo que 68% da produção concentra-se no estado do Rio Grande do Sul, onde praticamente a totalidade deste cultivo é irrigado por inundação, com uma área total semeada em torno de 1,12 milhões de hectares, com uma produtividade média de 7,30 t ha⁻¹ na safra 2014/2015 (CONAB, 2015).

Embora o Brasil não seja o centro da origem e domesticação do arroz, possui centenas de variedades tradicionais, também chamadas de crioulas. Esta variedade fornece aos programas de melhoramento de plantas valiosa fonte de informação genética (ARAUJO et al., 2003). Apesar dos ganhos genéticos alcançados, na melhoria da qualidade de grãos e no aumento de produtividade em nível de lavouras de arroz, há necessidade de uma ação contínua no desenvolvimento de novas cultivares, com características que atendam a crescente exigência dos produtores, indústria e consumidores finais (BRESEGHELLO et al., 2006).

A produção do arroz duplicou-se entre 1966 e 1990, principalmente devido ao lançamento comercial de cultivares altamente produtivas, ocorridas na “Revolução Verde” (KHUSH, 2005). Contudo, o uso intensivo do germoplasma melhorado, com genitores altamente aparentados entre si em programas de melhoramento, tem reduzido a variabilidade genética disponível para a realização de seleção (HOSSAIN, 2007).

Entre os principais estresses abióticos que afetam o desenvolvimento e produtividade de plantas cultiváveis, a temperatura baixa é um dos principais condicionantes negativos climáticos mais importantes para o crescimento, desenvolvimento e produtividade do arroz (CRUZ; MILACH, 2000), sendo

considerados uns dos elementos climáticos que estão intimamente relacionados com o decréscimo da produtividade (ALONÇO et al., 2005).

No período da germinação, a ocorrência de estresse por frio inibe o estabelecimento da planta, levando à maturidade desuniforme dos cultivos (LOU et al., 2007). Sendo assim, existe necessidade de um maior investimento no estudo deste fator.

O estresse por frio atua como um fator de estresse abiótico que possui um forte impacto na sobrevivência, desenvolvimento e reprodução desta cultura (AGHAEI et al., 2011).

A resposta das plantas ao estresse por frio pode ser observada por meio de alterações moleculares, celulares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (SANGHERA et al., 2011).

A ocorrência do estresse por frio tem se tornado um problema para a cultura em inúmeros países, dentre os quais, Austrália, China, Indonésia, Japão, Coreia, Nepal, Estados Unidos (YOSHIDA, 1981) e na América do Sul, principalmente no Chile (CASTILLO; ALVARADO, 2002) e no sul do Brasil (CRUZ; MILACH, 2000; STEINMETZ; BARGA, 2001). Devido aos vários efeitos do estresse por frio na cultura do arroz e o sério impacto na produtividade, a tolerância ao frio tem se tornado de considerável importância nessas regiões. Esforços para o desenvolvimento de cultivares com tolerância ao frio tem focado principalmente na germinação, estabelecimento de plântulas e no estágio reprodutivo.

No caso da germinação e estabelecimento de plântulas, temperaturas baixas do ar ou do solo podem impedir e retardar a germinação e o crescimento de plântulas, levando à redução de estande e ao atraso, bem como a não uniformidade na maturação (ANDAYA; TAI, 2006; LUO et al., 2007).

O estresse por frio pode reduzir a taxa metabólica, pois o cloroplasto é diretamente afetado pela baixa temperatura por danificar o aparelho fotossintético e a molécula de clorofila (STHAPIT; WITCOMBRE, 1998). Na fase de desenvolvimento vegetativo, o frio provoca redução no estabelecimento de plantas, taxa de desenvolvimento diário das folhas, afilamento, altura das plantas e baixa capacidade de competição do arroz em relação às plantas daninhas (FREITAS et al., 2011).

Além disso, o estudo relata que os fatores ambientais podem ocasionar alterações na quantidade de amido no grão de arroz, variando entre diferentes cultivares (FREI et al., 2003), sendo definida por diferentes variáveis e controlada por vários genes em interação com o ambiente (MARINI, 2012).

Os métodos de avaliação para tolerância ao frio no estágio de germinação foram desenvolvidos, ajudando na caracterização de genótipos tolerantes e sensíveis, estando disponíveis para a identificação de fontes de tolerância nos bancos de germoplasma. Estes métodos consistem basicamente na germinação de sementes em baixas temperaturas sob condições controladas, avaliando-se características como a de germinação, comprimento da radícula e comprimento do coleótilo (JONES; PETERSON, 1976; CRUZ; MILACH, 2004). Esses processos têm sido utilizados em estudos do controle genético, da tolerância ao frio na germinação (STHAPIT; WITCOMBRE, 1998; CRUZ et al., 2006; PACHECOY, 2011), mapeamento de *QTLs* (MIURA et al., 2001; FUJINO et al., 2004) e na caracterização de germoplasma (CASTILLO; ALVARADO, 2002; SHARIFI, 2010; SHARIFI; AMINPANAH, 2010; BOSETTI, 2012).

A utilização efetiva de recursos genéticos armazenados em bancos de germoplasma, tanto para ampliação da base genética como para introdução de características de interesse, envolvendo a descrição e registro de características morfológicas e moleculares, são importantes para determinar a variabilidade genética que existe no conjunto de genótipos, auxiliando, assim, os melhoristas na escolha dos genótipos como genitores dos programas de melhoramento. Ademais, estudos de variabilidade genética envolvendo genótipos do mundo todo (GARRIS et al., 2005; ALI et al., 2011; LI et al., 2010) e variedades locais (THOMSON et al., 2007; MAGALHÃES JR., 2007; EBANA et al., 2008; BORBA et al., 2009; THOMSON et al., 2009) têm sido realizados em arroz. Portanto, o desenvolvimento de cultivares adaptadas para temperaturas baixas que acontecem no sul do Brasil, bem como a compreensão da base genética para tolerância ao frio são essenciais para aumentar os patamares de produtividade da cultura do arroz.

As tecnologias de marcadores microssatélites (*SSR*, *Simple Sequence Repeats*), vem sendo utilizadas com sucesso na avaliação genética dos bancos de germoplasma (VARSHNEY et al., 2005), sendo adequados para estudos de

genotipagem e análise da variabilidade genética, uma vez que estes estão distribuídos ao acaso ao longo do genoma (XIE et al., 2010; BOUHADIDA et al., 2011), assim como pelo baixo custo e repetibilidade.

Essa tecnologia pode auxiliar a identificação de regiões genômicas responsáveis pela tolerância ao frio, facilitando a transferência destas regiões no germoplasma adaptado.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética dos genótipos pertencentes ao banco ativo de germoplasma do arroz da Embrapa, utilizando caracteres morfológicos e marcadores moleculares SSR para a identificação de variabilidade na tolerância ao frio na germinação.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAEI, A.; MORADI, F.; MAIVAN, H.Z.; ZARINKAMAR, F.; IRANDOOST, P.; AGHAEI, A.; MORADI, F.; MAIVAN, H.Z.; ZARINKAMAR, F.; IRANDOOST, P.; SHARIFI, P. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. **Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 39, p. 7617-7621, 2011.

ALI, M.L.; MCCLUNG, A.M.; JIA, M.H.; KIMBALL, J.A.; MCCOUCH, S.R.; EIZENGA, G.C. A rice diversity panel evaluated for genetic and agromorphological diversity between subpopulations and its geographic distribution. **Crop Science**, v. 51, p. 2021-2035, 2011.

ALONÇO, A. DOS S.; SANTOS, A.B. DOS; GOMES, A.DA S.; GRUTZMACHER, A.D.; ANDRES, A.; PRABHU, A.S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.M.; TERRES, A.; FERREIRA, C.M.; NUNES, C.D.; FRANCO, D.F.; PAULETTO, E.A.; MARCHEZAN, E.; FERREIRA, E.; VERNETTI JR, F. DE J.; BRAGA, H.J.; AZAMBUJA, E.H.V.; HECKLER, J.C. Fatores climáticos que afetam o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade do arroz irrigado. **Embrapa Clima temperado, Sistema de Produção**, (EMBRAPA. Documentos, 3, versão eletrônico), 2005.

ANDAYA, V.C.; TAI, T.H. Fine mapping of the qCTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 467-475, 2006.

ARAUJO, E.S.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Características morfológicas e molecular e acúmulo de proteína em grão de variedades de arroz do Maranhão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 38, n. 11, p. 1281-1288, 2003.

BOSETTI, F. Diversidade genética em germoplasma de arroz japonês utilizando marcadores moleculares e agromorfológicos. **Tese**. Área de

concentração: Genética e Melhoramento de Plantas. Universidad de São Paulo. 185p., 2012.

BORBA, T.C.O.; MENDES, C.A.; GUIMARÃES, E.P.; BRUNES, T.O.; FONSECA, J.R.; BRONDANI, R.V.; BRONDANI, C. Genetic variability of Brazilian rice landraces determined by SSR markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 706-712, 2009

BRESEGHELLO, F.; CASTRO, E.M. DE; MORAIS, O.P. DE. Progressos genéticos pelo melhoramento do arroz de terras altas da Embrapa para os estados de Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Piauí e Mato Grosso. Goiânia: **EMBRAPA, CNPAF**, (EMBRAPA, CNPAF.Documentos, 20), p.24, 2006.

BOUHADIDA, M.; MORENO, M.A.; GONZALO, M.J.; ALONSO, J.M.; GOGORCENA, Y. Genetic variability of introduced and local Spanish peach cultivars determined by SSR markers. **Tree Genetics e Genomes**, v. 7, p. 257-270, 2011.

CASTILLO, D.; ALVARADO, R. Caracterización de germoplasma de arroz para tolerancia a frío en la etapa de germinación. **Agricultura Técnica**, v. 62, n. 4, p. 596-605, 2002.

CONAB. Campanha Nacional de abastecimento. Safra 2014/15, v. 2, n. 6, p. 48-54 2014. Disponível: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1306&ordem=criterioSafra1> Acessado 11 Março 2015.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Inheritance of rice cold tolerance at the germination stage. **Genetics and Molecular Biology**. v. 29, n. 2, p. 314-320, 2006.

CRUZ, R.; MILACH, S.C.K. Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2004.

CRUZ, R.; MILACH, S.C.K. Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 909-917, 2000.

EBANA, K.; KOJIMA, Y.; FUKUOKA, S.; NAGAMINE, T.; KAWASE, M. Development of mini core collection of Japanese rice landrace. **Breeding Science**, v. 58, p. 281-291, 2008

FREI, M.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Studies on in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v.83, p.395-402. 2003.

FREITAS, D.A.C.; PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; ZIMMER, P.D.; FAGUNDES, P.R.R.; AMARAL, F.P.; RECH, E.G.; MENEGHELLO, G.E. Identification of genes involved in rice seed germination at low temperature. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, v.3, n.5, p. 83-88, 2011.

FUJINO, K.; SEKIGUCHI, H.; SATO, T.; KIUCHI, H.; NONOUE, Y.; TAKEUCHI, Y., ANDO, T.; LIN, S.Y.; YANO, M. Mapping quantitative trait loci controlling lowtemperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 794-799, 2004.

GARRIS, A.J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v. 169, n. 3, p. 1631-1638, 2005.

HOSSAIN, M. Rice facts: a balancing act. **Rice Today**, v. 6, p. 37, 2007.

IRGA. Instituto Rio-grandense do sul. Disponível: http://www.irga.rs.gov.br/upload/20140224154739cultivares_regionais_2013_14.pdf . Acessado: 20 janeiro, 2015

IRRI. [Rice science for a better world](http://www.irri.org/). Disponível: <http://irri.org/>. Acessado 15 janeiro 2015.

JONES, D.B.; PETERSON, M.L. Rice seedling vigor at sub-optimal temperatures. **Crop Science**, v. 16, p. 102-105, 1976.

KHUSH, G.S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**, v. 59, p. 1-6, 2005.

LI, X.; YAN, W.; AGRAMA, H.; HU, B.; JIA, L.; JIA, M.; JACKSON, A.; MOLDENHAUER, K.; McCLUNG, A.; WU, D. Genotypic and phenotypic characterization of genetic differentiation and diversity in the USDA rice mini-core collection. **Genetica**, v. 138, p. 1221-1230, 2010.

LOU, Q.J.; CHEN, L.; SUN, Z.X.; XING, Y.Z.; LI, J.; XU, X.Y.; MEI, H.W.; LUO, L.J. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, v. 158, p. 87-94. 2007.

MARINI, N. Qualidade de grãos, tolerância ao estresse por ferro e variabilidade genética em arroz. **Teses**. Universidade Federal de Pelotas. 126p. 2012.

MERTZ, L. M.; HENNING, F.A.; SOARES, R.C.; BALDIGA, R.F.; PESKE, F.B.; MORAES, D. M. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.254-262, 2009.

MIURA, K.; LIN, S.Y.; YANO, M.; NAGAMINE, T. Mapping quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Breeding Science**, v. 51, p. 293-299, 2001.

PACHECOY, M. I. Tolerancia ao frio em estádios tempranos del desarrollo em arroz: caracterización fenotípica de germoplasma de origen diverso y variación alélica em genes candidatos. **Dissertação**. Universidad Nacional de Mar de Plata. 73p., 2011.

SANGHERA, G.S.; WANI, S.H.; HUSSAIN, W.; SINGH, N.B. Engineering cold stress tolerance in crop plants. **Current Genomics**, v.12, n.1, p.30-43, 2011.

SHARIFI, P. Evaluation on sixty-eight rice germplasms in cold tolerance at germination stage. **Rice Science**, v.17, n.1, p. 77–81, 2010.

SHARIFI, P.; AMINPANAH, H. Evaluation eighteen rice genotypes in cold tolerance at germination stage. **World Applied Science Journal**, v. 11, p. 1476-1480, 2010.

STEINMETZ, S.; BRAGA, H. J. Zoneamento de arroz irrigado por época de semeadura nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**. v. 9, n. 3, p. 429-438, 2001.

STHAPIT, B.R.; WITCOMBRE, J.R. Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening. **Crop Science**, v. 38, p. 660-665, 1998.

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

THOMSON, M.J.; POLATO, N.R.; PRASETIYONO, J.; TRIJATMIKO, K.R.; SILITONGA, T.S.; MCCOUCH, S.R. Genetic diversity of isolated populations of Indonesian landraces of rice (*Oryza sativa* L.) collected in East Kalimantan on the Island of Borneo. **Rice**, v. 2, p. 80–92, 2009.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**. v.23, p.48-55, 2005.

XIE, R. J.; LI, X.W.; CHAI, M.L.; SONG, L.J.; JIA, H.J.; WU, D.J.; CHEN, M.K.; CHEN, K.M.; ARANZANA, M.J.; GAO, Z.S. Evaluation of the genetic diversity of Asian peach accessions using a selected set of SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 622-629, 2010.

XU, Y.; BEACHELL, H.; MCCOUCH, S.R. A marker-based approach to broadening the genetic base of rice in the USA. **Crop Science**, v. 44, p. 1947-1959, 2004.

YOSHIDA, S. Fundamentals of rice crop science. Los Baños: **International Rice Research Institute**, cap.1, p.1-63. 1981.

2. CAPITULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

IMPORTÂNCIA DOS CARACTERES FENOTÍPICOS E GENÉTICOS NO MELHORAMENTO DO ARROZ PARA TOLERÂNCIA AO FRIO

2.1 Importância da conservação do recurso genético no arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos alimentos mais importantes do mundo, sendo cultivado em mais de 100 países e consumido regularmente por mais de três bilhões de pessoas (IRRI, 2014). No Brasil, grande parte da área plantada compreende o sistema de cultivo irrigado (inundado), principalmente no estado do Rio Grande do Sul. Embora a produtividade tenha crescido nos últimos anos, não tem sido suficiente para suprir a demanda crescente por este tipo de alimento (MENDES, 2013).

Variedades tradicionais mantidas em bancos de germoplasma, são de grande importância para a ampliação da base genética em programas de melhoramento (LONDO et al., 2006; BOSETTI, 2012). Essas variedades tradicionais possuem grande valor por possuírem variabilidade genética e ao mesmo tempo complementarem o *pool* gênico de cultivares modernas, melhoradas recentemente. Representam, também, um estágio intermediário de domesticação entre um ancestral selvagem e as variedades modernas, servindo de reservatório da variabilidade (LONDO et al., 2007).

Estas variedades tradicionais são mantidas tanto pela capacidade de adaptação ao ambiente quanto pela seleção feita por produtores que determinam quais variedades são cultivadas no decorrer dos anos, sendo diferentes das populações selvagens que são disseminadas conforme a habilidade de sobreviver e competição sob condições naturais (THOMSON et al., 2009).

Os germoplasmas constituem os elementos dos recursos genéticos que influem na variabilidade genética e são utilizados especialmente no melhoramento genético de plantas (ACEVEDO et al., 2007). O uso intensivo do germoplasma melhorado do arroz, com genitores altamente aparentados entre si, reduziu a variabilidade genética disponível para se realizar a seleção e diminuiu a produtividade de 2,4% após a revolução verde no fim dos anos 80 para 0,9% por ano, atualmente (HOSSAIN, 2007; BOSETTI, 2012).

A estrutura genética de coleções nucleares de arroz tem sido alvo de muitos estudos (BORBA et al., 2009; LI et al., 2010; SHINADA et al., 2014), assim como a variabilidade genética do germoplasma do arroz, cultivado em uma escala global, tem sido bem caracterizada com marcadores moleculares (GARRIS et al., 2005; CAICEDO et al., 2007; ALI et al., 2011; SOW et al., 2014).

Na atualidade, a caracterização dos genótipos é feita tendo em consideração, principalmente, as características morfológicas, mas também os marcadores moleculares, os quais são excelentes ferramentas para ampliar esta caracterização (SOUZA, 2001). Apesar dos caracteres morfológicos serem amplamente usados no estudo da variabilidade, a combinação com os marcadores moleculares pode fornecer um quadro mais completo para o agrupamento de sub-amostras e o planejamento de cruzamentos no melhoramento genético (ARRIEL, 2004).

2.2 Caracterização morfológica do arroz

A caracterização morfológica tem sido realizada em coleções de germoplasma para fornecer informações sobre a descrição e a classificação dos genótipos conservados, na discriminação de caracteres mais relevantes e,

principalmente, para dar subsídio a programas de melhoramento genético por identificar indivíduos desejáveis e quantificar a variabilidade disponível (MELO, 2011).

As características morfológicas são fundamentais no melhoramento aplicado e, por isso, são extremamente usadas na caracterização da variabilidade genética. Além disso, a caracterização morfológica corresponde à base de todo e qualquer estudo, uma vez que a primeira determinação de um indivíduo começa pelo seu fenótipo, ou seja, pelo seu aspecto geral do ponto de vista morfológico (CHIES; LONGHI-WAGNER, 2003). Esta caracterização morfológica consiste em fornecer uma identidade para cada amostra através do conhecimento de uma série de dados que permitam estudar sua variabilidade genética (MELO, 2011).

Características morfológicas utilizadas como descritores mínimos na cultura do arroz foram estabelecidas pelo SNPC, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1997) e indicados pelo IRRI (1980), sendo 27 descritores mínimos estabelecidos para esta cultura na descrição das linhagens do melhoramento que estão em ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU).

A tolerância ao frio é uma dessas características, de suma importância em regiões onde a ocorrência de baixas temperaturas é comum durante o cultivo do arroz. Por esse motivo, a caracterização de genótipos tolerantes à esta condição adversa é de extrema importância para a região Sul do Brasil.

2.3 Caracterização molecular

Nas últimas décadas, novas classes de marcadores foram desenvolvidas visando, principalmente, obter uma maior cobertura genômica em menor tempo e com menor custo. Dentre estes, destacam-se os marcadores microsatélites ou *SSR* (*Simple Sequence Repeats*), utilizado com sucesso na avaliação da variabilidade genética nos bancos de germoplasma, sendo considerados ideais para a caracterização molecular por serem marcadores co-dominantes, abundantes, multialélicos e altamente polimórficos (VARSHNEY et al., 2005).

Na cultura do arroz, o número de marcadores microssatélites vem aumentando devido ao desenvolvimento de pesquisas e suas publicações (TEMNYKH et al. 2000, ALCOCHETE, 2005; GOULART et al., 2011; KANAWAPEE et al., 2011), existindo mais de 2000 marcadores microssatélites desenvolvidos para a cultura (McCOUCH et al., 2002) utilizados em estudos de variabilidade genética e estrutura de populações (NI et al., 2002; GARRIS et al., 2005; THOMSON et al., 2007; JIN et al., 2010).

Analizando a relação genética do arroz entre cultivares locais do grupo *japonica*, da Espanha, (Wankhade et al. 2010), utilizaram 30 genótipos e dez marcadores SSR para a caracterização da variabilidade genética inter e intra-varietal, ajudando, dessa forma, na caracterização das variedades e na avaliação da pureza do germoplasma (ARNAO et. al., 2007). Por estas razões, para obter informações dentro das subespécies de arroz é importante o conhecimento da variabilidade genética para a aplicação da seleção assistida (TEMNYKH et al., 2000).

Ao contrário do que se pensava inicialmente a respeito das funções dos microssatélites, muitos estudos demostram que os SSR estão envolvidos em diversos processos, como: organização dos cromossomos e regulação da atividade gênica (LI et al., 2002; LI et al., 2004; KANAWAPEE et al., 2011).

Atualmente, os marcadores moleculares são muito utilizados, pois são eficazes no estudo dos genomas, detectando polimorfismo diretamente no DNA e não tendo influência do ambiente. Além disso, são independentes do estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), podendo, ainda, auxiliar em diferentes etapas como a coleta, a caracterização, o manejo, a ampliação e o uso dos recursos genéticos (FALEIRO, 2007).

Ao estudar a variabilidade genética de duas subespécies, *indica* e *japonica*, mediante o uso de marcadores moleculares (SSR e AFLP), observou-se suficiente polimorfismo para diferenciar claramente as duas sub-espécies (ARNAO et al., 2007).

Li et al. (2010), em estudo da mini coleção nuclear de arroz do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), afirmaram que a

diferenciação genética identificada por marcadores moleculares foi alta e significativamente correlacionada com a diferenciação por características fenotípicas.

Do mesmo modo, marcadores microssatélites foram utilizados para estimar a distância máxima de 3,6m de fluxo gênico entre arroz cultivado e a espécie silvestre *O. rufipogon* (SONG et al., 2003). Dessa forma, os SSR podem ser utilizados como ferramenta para a detecção de fluxo gênico em arroz, além de ser empregados em associação com outras metodologias (BRUNES et al., 2007).

Os descritores utilizados para arroz são baseados, principalmente, nas diferenças morfológicas (BIOVERSITY INTERNATIONAL; IRRI; WARDA, 2007) e tem sido usados para identificação de cultivares, estudos de variabilidade em banco de germoplasma e identificação de indivíduos como genótipos potenciais para serem incorporados em programas de melhoramento (BOSETTI, 2012).

Do mesmo modo, analisando a distância genética em doze genótipos de arroz comercial, utilizando 100 marcadores SSR, Rajemdran et al. (2012) observaram que os marcadores moleculares são de utilidade para a identificação de variedades, assim como análise de pureza genética.

A utilização de métodos moleculares combinados com informações fenotípicas fornecem informação mais completa e precisa para os agrupamentos, permitindo ao melhorista selecionar de maneira mais eficiente acessos úteis a programas de melhoramento genético, além de ter várias aplicações (HARRISON et al., 2000).

2.4 Resposta ao frio em genótipos de arroz

A cultura do arroz apresenta vulnerabilidade às alterações climáticas, assim como a ocorrência de doenças e pragas, resultando em um decréscimo no desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, na sua produtividade (WALTER et al., 2010).

Além disso, o estresse por frio pode afetar o desenvolvimento da cultura desde a germinação até o enchimento do grão, reduzindo seu rendimento

(YOSHIDA et al., 1997; MACKILL; LEI et al., 1997), assim como na germinação, o estabelecimento das plântulas, diferenciação dos primórdios florais (início do estágio reprodutivo) (YE et al., 2009). Existem, ainda, diferenças em relação à outras espécies que podem aclimatar-se, aumentando sua tolerância logo após serem expostas a temperaturas intermediárias (MOYNIHAN et al., 1995), sendo que o arroz não apresenta essa capacidade de aclimação (SATO, 2001).

Mudanças na expressão gênica ocorrem em todas as espécies durante a aclimação ao frio. Trabalhos realizados por Mohapatra et al. (1989); Hazen et al. (2003) e Winfield et al. (2010) observaram o nível de expressão de alguns genes regulados pelo frio em diferentes cultivares, obtendo conhecimento detalhado de respostas a estresses abióticos.

Conforme ocorreu a disseminação do arroz por muitas regiões do mundo, as espécies foram diferenciando-se com relação a resposta às temperaturas, devido adaptação a diferentes regiões, sendo que o grupo *japonica* adaptou-se em áreas de alta latitude, enquanto que a subespécie *indica* adaptou-se às condições tropicais (TORO, 2006). Assim, as diferenças genotípicas de tolerância ao frio na fase de germinação-emergência estão relacionadas com a adaptação às condições específicas que as espécies e subespécies sofrem.

Além disso, diversos métodos de avaliação da tolerância ao frio no estágio de germinação foram desenvolvidos, permitindo a caracterização de genótipos tolerantes e sensíveis (JONES; PETERSON, 1976; CRUZ; MILACH, 2004), estando disponíveis para a identificação de fontes de tolerância nos bancos de germoplasma. Características como o índice de germinação, o comprimento da radícula e o comprimento do coleóptilo tem sido utilizadas em estudos do controle genético da tolerância ao frio na germinação (STHAPIT; WITCOMBRE, 1998; CRUZ et al., 2004), mapeamento de *QTLs* (MIURA et al., 2001; FUJINO et al., 2004) e na caracterização de germoplasma (CASTILLO; ALVARADO, 2002; SHARIFI, 2010; SHARIFI; AMINPANAH, 2010).

Temperaturas abaixo de 15°C afetam os três estádios da cultura do arroz: a germinação, o desenvolvimento vegetativo e o período reprodutivo (YOSHIDA, 1981). O comportamento das plantas nos diferentes estádios não está

correlacionado, existindo comumente genótipos tolerantes ou sensíveis ou vice versa, em alguns dos estádios da planta (CRUZ; MILACH, 2004).

Ademais, pesquisas tem mostrado o efeito do frio na germinação em genótipos provenientes de áreas de alta latitude, os quais apresentaram uma rápida germinação em relação aos genótipos provenientes de baixas latitudes. Comparações entre os grupos *indica* e *japonica* demonstram que estas podem germinar a baixas temperaturas (8°C) sendo, provavelmente, cultivadas nas regiões temperadas, enquanto que as *indica* não possuem tolerância ao frio (TANKSLEY; McCOUCH, 1007; FUJINO et al., 2004).

A intensidade do frio, a duração da exposição e a avaliação da recuperação são importantes para uma estimativa efetiva da tolerância à baixas temperaturas (LOU et al., 2007).

Fora isso, os efeitos ocasionados pelo estresse por frio no estágio reprodutivo são irreversíveis, ocasionando a diminuição da produtividade de grãos (SATAKE, 1991; GUNAWARDENA et al., 2002). O frio provoca inibição no desenvolvimento do grão de pólen, resultando, finalmente, em esterilidade (KHAN et al., 1986). Isso acontece através do acúmulo de açúcares e amido nas células do tapete, causando uma hipertrofia, o que origina uma interrupção da nutrição dos micrósporos, deixando o grão de pólen com maturação incompleta (SATAKE, 1976; SATAKE, 1991; NISHIYAMA, 1993).

A tolerância ao frio é um fenômeno complexo, pois é dependente da fase do desenvolvimento do vegetal e da ocorrência simultânea de outros estresses (CHINNUSAMY et al., 2004), acarretando uma série de mudanças moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (WANG et al., 2003). Além disso, um estudo preliminar relata que os fatores genéticos e ambientais podem ocasionar alterações na quantidade de amido no grão de arroz, variando entre diferentes cultivares (FREI et al., 2003).

Muitos estudos têm sido realizados utilizando linhagens endogâmicas recombinantes (*RILs*), utilizando cruzamento entre genótipos sensíveis ao frio da espécie *indica* e uma tolerante da espécie *japonica* (LOU et al., 2007; JI et

al., 2010; ANDAYA; MACKILL, 2003; ANDAYA; TAI, 2006; JIANG et al., 2008; WANG et al., 2009; KIM; TAI, 2011).

Estudos de mapeamento genético utilizando populações de cruzamento entre *japonica* e *indica* identificaram tolerância ao frio por uma série de *loci* de características quantitativas (QTLs) (LOU et al., 2007; JIANG et al., 2008; BARUAH et al., 2009). A maior parte dos QTLs não tem sido atribuídas para as mesmas regiões genômicas, demonstrando as diferenças entre as populações de mapeamento para as condições de estresse à baixa temperatura e para os métodos utilizados para as avaliações da tolerância ao frio.

2.5 Importância da variabilidade e base genética na cultura do arroz

As informações moleculares de variabilidade e distância genética podem auxiliar no direcionamento do enriquecimento da base genética em um programa de melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A utilização de recursos genéticos disponíveis em bancos de germoplasma é uma estratégia importante para incorporar variabilidade nos programas de melhoramento, podendo potencialmente gerar novas cultivares com o aumento da base genética e obtenção de novas combinações alélicas (McCOUCH, 2005).

Estudos tem demonstrado que a base genética do arroz na América Latina é estreita (CUEVAS-PEREZ et al., 1992; RANGEL et al., 1996). No entanto, a vulnerabilidade genética resulta quando um organismo carece de genes e/ou alelos que lhe permita tolerar um estresse ambiental ou biológico, levando, assim, à vulnerabilidade da cultura (RAIMONDI et al., 2014).

Para o emprego das estratégias de melhoramento é necessário o conhecimento da base genética da espécie com o intuito de aumentar os ganhos por seleção, reduzindo a vulnerabilidade genética (ACEVEDO et al., 2007).

Para a realização de cruzamentos, informações sobre a variabilidade e estrutura da população são essenciais para seleção de características importantes, expandindo o acervo dos genes para identificar genótipos que

tenham genes e/ou alelos de importância para os melhoristas (GARRIS et al., 2005).

Em arroz, a análise da estrutura genética de populações possibilita a caracterização da variabilidade intra-específica de acesso de germoplasma, e permite estimar os relacionamentos entre grupos dentro da espécie estudada. Um trabalho realizado por Raimondi et al. (2014) avaliou 40 genótipos de arroz desenvolvidos no Sul de Brasil utilizando *AFLP* e a genealogia, indicou que 90% das cultivares foram desenvolvidas a partir de apenas seis progenitores, revelando uma base genética estreita entre essas cultivares.

A variabilidade genética refere-se ao grau em que o material genético difere entre indivíduos de uma população (MOREIRA et al., 1994; DINIZ; FERREIRA, 2000). É extremamente importante no melhoramento de plantas por fornecerem parâmetros para identificação de genitores que quando cruzados, possibilitam o desenvolvimento das cultivares superiores (CARGNIN et al., 2010).

A redução da variabilidade genética ocasiona a diminuição do ganho genético por ciclo de seleção. A escolha de acessos geneticamente distintos em relação aos genitores elites, armazenados em bancos de germoplasma para integrarem o programa de melhoramento genético é uma alternativa viável para ampliação da base genética de arroz cultivado (SANTOS et al., 2006).

Trabalhos realizados por Zhu et al. (2007) estimaram que o arroz cultivado contém aproximadamente 25% da variabilidade genética de seus progenitores silvestres, representando uma forte erosão genética durante a domesticação. Além disso, um nível significativo da variabilidade genética foi perdido durante o melhoramento do arroz (CHOUDHURY et al., 2013).

Outrossim, inúmeros trabalhos que avaliaram a variabilidade genética utilizando caracteres morfológicos e marcadores moleculares foram realizados nos últimos anos (BERTINI et al., 2010; BOSETTI, 2012; CHOUDHURY et al., 2013), e permitiram o conhecimento das melhores combinações híbridas, viabilizando a obtenção de genótipos superiores nas gerações segregantes (BENITEZ et al., 2011).

2.6 Genealogia das variedades de arroz

Para que a base genética possa ser ampliada, é de fundamental importância que seja conhecida a genealogia dos genótipos a serem utilizados, podendo, assim, evitar ou diminuir os cruzamentos aparentados (SILVA et al., 1999). A falta de divulgação das genealogias é um dos fatores que dificultam a ampliação da base genética do arroz no País.

Um estudo recente sugere que uma das duas subespécies de arroz asiático, *O. sativa* ssp *indica* foi domesticado no Sudeste e Sul da Ásia, enquanto a outra subespécie, *O. sativa* ssp *japonica* foi domesticada no sul da China (HUANG et al. 2012).

A seleção natural e humana, diversidade climática, solos e práticas agrícolas levaram a um aumento da variabilidade no arroz, contribuindo, também, para diversificação do cultivo, como o de sequeiro e irrigado. As variedades tradicionais são mais adaptadas ao sistema de sequeiro e caracterizam-se por apresentar ciclo vegetativo mais curto, pouca capacidade de afilamento, raízes longas, panículas longas resistentes ao degrane, grãos longos e espessos, folhas e glumas glabras (VIEIRA, 2007).

Estudando a base genética na América Latina, a maior parte dos genes das variedades comerciais são oriundas da Deo Geo Woo Gen (DGWG), Peta (Cina/ Lati Sail), progenitores do cultivar IR8 (CUEVAS-PEREZ et al., 1992; ACEVEDO et al., 2007). A importância deste progenitor é que na composição das cultivares atuais, bem como devido ao uso intenso da cultivar IR8 nos cruzamentos, visava-se a obtenção de cultivares semianãs altamente produtivas (BRESEGHELLO et al., 1999).

Trabalhos utilizando 42 cultivares recomendados no Brasil, observaram que apenas 10 progenitores contribuíram com 68% do conjunto gênico. Considerando que os progenitores de mesma origem podem estar relacionados, é possível que a base genética das cultivares de arroz irrigado do Brasil seja ainda mais estreita (RANGEL et al., 1996). Ademais, as cultivares de arroz desenvolvidas no Sul do

Brasil, por motivo da base genética estreita, sugere riscos da alta vulnerabilidade na cultura (ACEVERDO et al., 2007; RAIMONDI et al., 2014).

Outro genótipo que foi utilizada como progenitor é o Tetep, conhecida por ser uma importante fonte de resistência à brusone, sendo que sua composição nas linhagens são de 8,3%. O genótipo Tadukan foi utilizado com o mesmo objetivo, mas com menor frequência, aportando 4,7% dos genes, e os progenitores I Geo Tze, Mong Chin Vang A e Remadja participam com 5% (BRESEGHELLO et al., 1999).

Do mesmo modo, variedades de grão longo Lebonnet e Lemont possuem mais de 72% dos genes em comum, no entanto, a variedade do grão médio Calrose e Caloro possuem 9% dos seus genes em comum, mostrando, assim, a estreita base genética dos genótipos de arroz dos EUA (DILDAY, 1990).

Quanto a origem geográfica, foi verificada a predominância absoluta das variedades asiáticas (ACEVEDO et al., 2007). Um trabalho realizado por Breseghello (et al. 1999) analisando 62 genótipos da Região Nordeste do Brasil, observou que entre os vinte progenitores identificados, apenas cinco não são provenientes da Ásia, totalizando 6,1% do conjunto gênico das linhagens.

Dessa forma, o conhecimento e o entendimento da base genética torna-se fundamental para desenhar estratégias de melhoramento para aumentar o ganho por seleção e reduzir a vulnerabilidade genética.

3. CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE GENÓTIPOS DE ARROZ PARA TOLERÂNCIA AO FRIO NO ESTÁDIO GERMINATIVO

3.1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado uma das culturas mais importantes no mundo, apresentando ampla adaptação às diferentes condições de solo e clima, bem como grande potencial de aumento de produção, podendo ser considerada como uma estratégia para o combate à fome no mundo (MENEZES et al., 2012). É considerado um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas. O Rio Grande do Sul é considerado um dos principais produtores brasileiros de arroz irrigado, com produtividade média em torno de 7,30 t ha⁻¹ (CONAB, 2015), o que corresponde a 61% da produção nacional (SOSBAI, 2014).

Fora isso, mesmo apresentando boa produtividade, observa-se uma variação acentuada ao longo dos anos, causada, fundamentalmente, pelas condições climáticas (STEINMETZ et al., 2005; DA LUZ, 2011).

Temperaturas abaixo de 20°C podem ser prejudiciais para a cultura do arroz, sendo muito comuns em áreas temperadas e subtropicais (NANDA; SESHU, 1979). Sendo assim, a semeadura deve ser realizada em uma época que possibilite a coincidência com o mês que tenha as menores probabilidades de ocorrência de temperaturas baixas, uma vez que a temperatura é considerada um

dos elementos climáticos de maior importância para o crescimento, desenvolvimento e produtividade do arroz (SOSBAI, 2014).

Para aumentar a produtividade da cultura de arroz, é importante desenvolver estratégias para minimizar perdas devido aos estresses bióticos e abióticos, mediante o desenvolvimento de variedades tolerantes a estes fatores adversos (BOYER, 1982; KHUSH, 1999; JENA; MACKILL, 2008).

O frio pode gerar estresse osmótico pela incidência no consumo e perda de água, ficando uma maior concentração de solutos nas células. Também ocasiona a redução na razão fotossintética e na taxa de respiração de vários órgãos e, por consequência, na absorção dos nutrientes (TERRES et al., 1994), podendo causar prejuízos ao arroz tanto na fase de germinação-emergência, quanto na fase reprodutiva e de maturação de plantas.

Os sintomas causados pelo frio, observados no período de germinação e no desenvolvimento da planta são o atraso e diminuição na porcentagem de emergência, baixa síntese de clorofila na plântula, necrose no tecido radicular, atraso no crescimento, folhas amareladas, atraso na antese, esterilidade e inibição do enchimento de grãos (KANEDA; BEACHELL, 1974; VERGARA, 1976; MACKILL; LEI, 1997; JIANG et al., 2008; KIM; TAI, 2011). A tolerância ao frio é uma característica de difícil seleção de campo, uma vez que a ocorrência do estresse é imprevisível.

O estresse por frio durante o estágio vegetativo e reprodutivo provoca grandes impactos na produtividade. Assim, o desenvolvimento de cultivares de arroz tolerantes ao frio torna-se imprescindível (ANDAYA; TAI, 2006).

Os genótipos tolerantes atualmente disponíveis vieram de outros países, sendo selecionados de diferentes ambientes. Frequentemente estes genótipos são do tipo *japonica*, grão curto. No entanto, no Brasil os genótipos mais semeados são de grão longo tipo *indica*. No estado de Rio Grande do Sul, a instabilidade relacionada a ocorrência de baixas temperaturas é agravada pela utilização, na maior parte da área orizícola, de cultivares semi-anãs pertencentes ao grupo *indica*, menos adaptadas às baixas temperaturas do que as cultivares do grupo *japonico* (FAGUNDES et al., 2010; SOSBAI, 2014).

Um dos principais fatores que influenciam o início da semeadura do arroz no Estado é a temperatura do solo, que interfere diretamente na velocidade de germinação das sementes. A faixa de temperatura ótima para a germinação situa-se entre 20°C e 35°C (YOSHIDA, 1981; FAO, 2003; SHARIFI, 2010), sendo que na temperatura de 25°C, a germinação é mais rápida (AMARAL; SANTOS, 1983). Por outro lado, a germinação é mais lenta abaixo de 20°C. Sendo assim, o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao frio é umas das alternativas mais efetivas para evitar os danos por este fator (LOU et al., 2007; RANAWAKE et al., 2014).

Para a realização de uma estimativa da tolerância ao frio, tem que ser considerada a intensidade do tratamento utilizado, a duração da exposição e o poder de recuperação da planta, sendo estas características de suma importância (LOU et al., 2007). Dessa forma, foram desenvolvidos os índices para ambientes controlados. Estes índices têm sido utilizados para avaliar o rendimento na cultura do feijão realizados por Porch et al. (2006), sendo testados para comparar o desempenho do arroz em condições de baixas temperaturas (DA LUZ, 2011; CRUZ; MILACH, 2004), exigindo a realização de mais pesquisas com estes parâmetros.

Outrossim, vários procedimentos de avaliação estão sendo realizados para selecionar genótipos tolerantes ao estresse por frio em períodos específicos de desenvolvimento da planta. Na germinação, a avaliação da tolerância ao frio tem sido feita submetendo-se as sementes à temperaturas que variam desde 10 °C até 25°C por períodos de três até 35 dias, sendo que as características mais comumente medidas por vários autores são: a porcentagem e a velocidade de germinação e o comprimento do coleóptilo e radícula (BERTIN et al., 1996; STHAPIT; WITCOMBE, 1998; DA LUZ, 2011; CRUZ; MILACH, 2004).

Muitos dos tratamentos para induzir o estresse por frio utilizam temperatura constante, como 4°C (ZHAN et al., 2005), 5°C (NAGAMINE, 1991; ABBASI et al., 2004; BARUAH et al., 2009), 6°C (JIANG et al., 2008), 9°C (ANDAYA; MACKILL, 2003; ANDAYA; TAI, 2006; KIM; TAI, 2011), 10°C (ZHANG et al., 2005; BEVILACQUA, 2013), 12°C (ZHAN et al., 2005), 13°C (CRUZ; MILACH, 2004;

RODRIGUES et al., 2014) e 15°C (YOSHIDA et al., 1996) para avaliação no estágio de plântula, no entanto, para as avaliações na germinação as temperaturas mais utilizadas são 12°C (CORREDOR et al., 2007), 13°C (CRUZ et al., 2006), 14°C (WANG et al., 2009), e 15°C (MIURA et al., 2001; FUJINO et al., 2004). Outros estudos, no entanto, utilizam temperaturas variáveis entre o dia e a noite, tais como 10 a 6°C (QIAN et al., 2000; LOU et al., 2007), 25 a 9°C (ANDAYA et al., 2003, 2007), 12 a 10°C (JI et al., 2010).

A caracterização de genótipos tolerantes ao estresse por frio é de grande importância para identificar genitores para posterior utilização em cruzamentos direcionados.

O objetivo do trabalho foi caracterizar 0124 genótipos de arroz do Banco Ativo de germoplasma da Embrapa, para tolerância ao frio no estágio germinativo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento (fitotron) da Embrapa Clima Temperado e as avaliações foram realizadas no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

Cento e vinte e quatro genótipos de arroz de diferentes subespécies do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa foram estudados (Anexo I), tendo sido realizado teste de germinação para todos os genótipos estudados, com a finalidade de conhecer a qualidade das sementes.

Para a seleção dos melhores genótipos para posterior utilização como referência na classificação quanto à tolerância ao frio na germinação (testemunhas), foram utilizados seis genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), sendo três pertencentes ao grupo *japonica* (Oro, Brilhante e Diamante) e três do grupo *indica* (BR IRGA 410, IR8 e CICA8).

Dos seis genótipos avaliados, IR8 e BR IRGA, 410 foram escolhidos por serem reconhecidos como sendo sensíveis ao estresse por frio e os genótipos ORO e Brilhante como genótipos tolerantes.

Duas metodologias foram utilizadas para caracterização dos genótipos para tolerância ao frio, as quais são descritas no experimento I e II, respectivamente.

Nos dois experimentos as sementes foram semeadas em rolos de papel umedecidos com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato, seguindo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), e colocadas para germinar em Fitotron na Embrapa Clima Temperado.

3.2.1 Experimento I- Estresse por frio na germinação

Neste experimento as sementes dos 124 genótipos foram submetidas à germinação em duas condições: 13°C por 28 dias (estresse por frio) e 25°C por 07 dias (controle) (CRUZ; MILACH, 2004).

O experimento foi conduzido com um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes. Em cada rolo de papel foram avaliadas 10 plântulas, escolhidas aleatoriamente. As variáveis avaliadas foram: comprimento de coleóptilo (cm), comprimento de raiz (cm), comprimento de parte aérea (cm) e germinação (consideradas as plantas normais entre as 50 sementes de cada rolo).

Para a comparação de médias, foi realizado o desempenho relativo do comprimento do coleóptilo (DRcc), comprimento de raiz (DRcr), comprimento de parte aérea (DRcpa) e a germinação (DRgrm), comparando a temperatura 13°C em relação aos 25°C, de acordo com a equação:

$$DR_{\text{variável}} = (\bar{X}_{\text{variável } 13^{\circ}\text{C}} / \bar{X}_{\text{variável } 25^{\circ}\text{C}}) * 100$$

onde: $\bar{X}_{13^{\circ}\text{C}}$; média da variável aos 28 dias a 13°C;

$\bar{X}_{25^{\circ}\text{C}}$; média da variável aos 7 dias a 25°C.

Os dados, então, foram submetidos à análise para verificar a normalidade dos resíduos e homogeneidade da variância, constatando-se a necessidade de

transformação dos dados. Posteriormente, os dados foram transformados com auxílio do programa computacional SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002).

Os dados referentes à porcentagem do desempenho relativo foram transformados conforme fórmula indicada pelo programa computacional SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002);

$$X_{trasf} = \sqrt{x}$$

Após a transformação, os dados foram submetidos a análise da variância ($p \leq 0,05$) e, posteriormente, foi realizada uma análise do agrupamento entre as médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa computacional Genes (CRUZ, 2001). Os dados foram submetidos ao teste de correlação de Pearson, com auxílio do programa computacional SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002).

Também foi realizada análise de agrupamento pelo algoritmo de otimização de Tocher, obtida a partir da distância genealógica de Mahalanobis (D^2) e calculada usando o DR de todas as variáveis.

Por último, foi realizada a análise por variáveis canônicas, que combinada com os resultados do agrupamento obtido por Tocher, permitiu a visualização da variabilidade a partir da dispersão gráfica dos genótipos e separação de grupos.

3.2.1 Experimento II- Geminação sob oscilação de temperatura

Neste experimento, as sementes dos 124 genótipos foram submetidas à germinação sob oscilação de temperatura, nas seguintes condições: 25°C durante 72 horas, 13°C por 96 horas (estresse por frio- comprimento 1) e novamente 25°C por 72 horas (controle- comprimento 2) (CRUZ; MILACH, 2004), com a finalidade de simular a variação de temperatura em situação de campo, bem assim verificar o comportamento dos genótipos sobre a capacidade de recuperação após o período do frio.

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes. De cada rolo de papel, foram avaliadas 10 plântulas, escolhidas aleatoriamente.

A avaliação da tolerância ao frio foi realizada através do recrescimento do coleóptilo (RCOL) em cm, que consistiu na diferença entre o comprimento 2 (25°C) e o comprimento 1 (13°C), ou seja, na capacidade de crescimento do coleóptilo após o período de frio, de acordo com a fórmula abaixo, onde o comprimento do coleóptilo é a média das 10 plântulas avaliadas por repetição para cada genótipo:

$$\text{RCOL (cm)} = (\text{comprimento 2}) - (\text{comprimento 1})$$

Estes dados foram submetidos a análise para verificar normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância. Os resultados indicaram a necessidade de transformação dos dados pela fórmula da raiz quadrada $\sqrt{x}$, o que foi realizado com o auxílio do programa computacional SAS (SAS LEARNING EDITION, 2002).

Os dados foram, então, submetidos a análise da variância ($p \leq 0,05$) e o agrupamento das médias foi realizado pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa computacional Genes (CRUZ, 2001).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, pode-se observar o resumo da análise da variância para os genótipos a serem utilizados como referência, os quais apresentaram diferenças significativas de 5% para todas as características avaliadas nos seis genótipos (Tabela 1), indicando, assim, a existência de genótipos contrastantes para tolerância ao frio na germinação, a serem utilizados como genótipos de referências.

Tabela 1. Resumo da análise de variância do desempenho relativo dos caracteres comprimento de coleóptilo (DRcc), comprimento de raiz (DRcr), comprimento de parte aérea (DRcpa) e germinação (DRgrm) avaliados em seis genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		DRcc	DRcr	DRcpa	DRgrm
Genótipos	5	3,54*	3,61*	8,82*	14,69*
Resíduo	18	0,64	0,67	0,23	0,28
Média Geral	–	8,28	3,58	4,96	7,27
CV (%)	–	9,70	22,99	9,85	7,29

*Valores significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.
GL= graus de liberdade.

Para a diferenciação das testemunhas com maior tolerância ao frio (Tabela 2), houveram diferentes respostas entre os genótipos para as quatro variáveis analisadas quando submetidas ao estresse por frio. Pode-se dizer que os genótipos escolhidos para serem utilizados como referências auxiliaram na classificação da tolerância ao frio.

Além disso, foram verificadas diferenças significativas no desempenho relativo para as variáveis, comprimento de coleóptilo, raiz, parte aérea e germinação (Tabela 2). Os resultados indicaram que a cultivar Brilhante é superior seguido pela cultivar Oro, para todos os caracteres avaliados, podendo ser indicada como tolerante e moderadamente tolerante neste tipo de experimento.

Por outro lado, a cultivar com os resultados mais baixos foram as IR8 e BR IRGA 410, que foram utilizadas como sensíveis neste estudo. Cruz et al. (2007)

verificaram que os genótipos do grupo *japonica* são superiores aos genótipos do grupo *indica* quanto à tolerância ao frio, corroborando com pesquisas realizadas por Li et al. (1981).

Tabela 2. Desempenho relativo (DR) das variáveis comprimento de coleótilo (DRcc), comprimento de raiz (DRcr), comprimento de parte aérea (DRcpa) e germinação (DRgrm) das testemunhas utilizadas. Embrapa/FAEM/UFPeI-CGF, Pelotas-RS, 2015.

	Genótipos	DRcc (%)	DRcr (%)	DRcpa (%)	DRgrm (%)
Tolerantes	Brilhante	100,98 a	27,41 a	63,31 a	95,75 a
	ORO	75,64 b	16,68 b	23,08 b	53,72 b
	Diamante	68,72 b	6,57 c	17,13 b	83,71 a
Sensíveis	BR IRGA 410	58,50 b	6,81 c	16,88 b	25,43 c
	CICA8	59,92 b	14,59 b	22,46 b	29,35 c
	IR8	55,36 b	12,33 b	17,22 b	49,46 b

*Mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

3.3.1 Experimento I- Estresse por frio na germinação

No experimento I, a caracterização dos genótipos de arroz pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa apresentou diferenças significativas a 5% para todas as características avaliadas nos 124 genótipos (Tabela 3), indicando, assim, a existência de diferenças para tolerância ao frio na germinação, as quais podem ser atribuídas às diferenças genéticas entre os genótipos.

Tabela 3 Resumo da análise de variância do desempenho relativo dos caracteres comprimento de coleótilo (DRcc), comprimento de raiz (DRcr), comprimento de parte aérea (DRcpa) e germinação (DRgrm) avaliados em 124 genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPeI-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio			
		DRcc	DRcr	DRcpa	DRgrm
Genótipos	123	32,62*	11,18*	15,72*	42,36*
Resíduo	372	1,74	0,33	0,64	0,57
Média Geral	–	7,13	2,55	3,82	5,78
CV (%)	–	18,49	22,64	20,89	13,09

*Valores significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

GL= graus de liberdade.

Para o desempenho relativo do coleóptilo (DRcc), pode ser observada a conformação de seis grupos (Tabela 4). No grupo A, encontram-se 14 genótipos (11,29%) sendo, BRS 7 Taim, Rio Grande, EEA 405, BRA 050069, Arroz Pássaro, Reetz, Supremo 13, Ambar, BR IRGA 411, BRA 02665, IRCTN HSC 16, Oryzica 1, BRS Fronteira, onde o desempenho relativo foi significativamente semelhante à testemunha Brilhante (121), sendo que o desempenho relativo variou entre 139,97 até 95,26%, o DRcc da testemunha foi de 100,98% (Brilhante).

Quando observados os resultados com relação à testemunha para o caráter de DRcc, oito genótipos tiveram DRcc superior a testemunha tolerante Brilhante (121) e cinco genótipos com DRcc inferior. Posto isso, pode-se afirmar que estes genótipos quando avaliados o DRcc são tolerantes ao estresse por frio. Sharifi (2010) estudou 68 genótipos de arroz com a finalidade de avaliar a tolerância ao frio no estágio de germinação mostrou que a germinação, comprimento da raiz e o comprimento do coleóptilo foram fortemente afetados pelo frio, podendo ser esse o motivo que os genótipos de arroz tiveram diferentes respostas quando avaliados juntos.

O grupo B formado por 34 genótipos (27,41%) teve desempenho relativo do coleóptilo, significativamente igual a testemunha Oro (122) e com DRcc que variaram entre 90,02 até 69,82%. No entanto, o DRcc apresentado pela testemunha foi de 75,64%. Observando todos os genótipos com relação a testemunha tolerante Oro (122), verificou-se que 21 genótipos (16,94%) tiveram DRcc superior a esta testemunha, e 12 genótipos (9,68%) apresentaram desempenho inferior, variando entre 75,54 a 69,82%, podendo, assim, caracterizar estes genótipos como tolerantes intermediários.

A ocorrência de baixas temperaturas afetam a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de arroz (YOSHIDA, 1981). Trabalhos realizados por Ranawake et al. (2014) corroboram que a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula são as duas características principais para o estabelecimento da cultura de arroz.

Tabela 4. Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do Desempenho relativo do comprimento de coleóptilo (DRcc), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Desempenho relativo do coleóptilo (%)											
Grupo	Maior DRcc	Testem. DRcc	Menor DRcc	Identificação dos genótipos							
A	139,97	100,98	95,26	119	103	100	88	93	81	12	50
				121^a	69	113	104	118	51		
B	90,02	75,64	69,82	26	87	31	21	90	64	39	27
				74	55	52	97	45	54	101	76
				60	61	111	72	19	122^b	107	91
				117	115	92	48	30	58	108	94
				78	68						
C	69,20	58,50	31,88	28	7	80	75	106	96	17	15
				116	18	82	23	114	3	13	32
		20		25	1	44	6	24	124^d	56	
		57		71	85	36	86	98	83	123^c	
		29		65	4	10	62	120	5	79	
		53		11	77	40	59	95	89	105	
		47		42	34	16	66	2	14	38	
D	29,42		16,51	112	37	109	102	41	67		
E	15,72		8,93	8	110	99	63				
F	0,00		0,00	9	22	33	35	43	46	49	70
				73	84						

*Genótipos pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5%

Tolerantes: a: **121** (Brilhante DRcc=100,98%); b: **122** (Oro DRcc= 75,64%);

Sensíveis: c: **123** (IR8 DRcc=58,50%); d: **124** (IRGA 410 DRcc=55,37%)

O grupo C (Tabela 4), composto por 56 genótipos (45,16%), foram significativamente semelhantes às testemunhas BR IRGA 410(124) e IR8 (123), com DRcc que variaram entre 69,20 até 31,88%. O desempenho relativo das testemunhas foram de 58,50 e 55,37%, respectivamente.

Um total de 22 genótipos (17,74%) apresentaram um comportamento superior a testemunha sensível BR IRGA 410 (DRcc = 58,50%). Do mesmo modo, 8 genótipos (6,45%) apresentaram desempenho superior a testemunha IR8 (DRcc = 55,37%), sendo que 24 genótipos (19,35%) apresentaram um desempenho

inferior às duas testemunhas. Desta forma, pode-se considerar estes genótipos como sendo sensíveis ou moderadamente sensíveis ao estresse por frio.

Em contrapartida, observou-se três grupos distintos inferiores às testemunhas sensíveis, sendo o grupo D formado por seis genótipos com DRcc entre 29,42 até 16,51%, o grupo E formado por quatro genótipos variando entre 15,72 até 8,93% e o grupo F formado por 10 genótipos (8,06%), que não ocorreu desenvolvimento do coleóptilo (DRcc igual a 0%) quando submetidos ao estresse por frio, podendo ser considerados extremamente sensíveis ao frio.

Ademais, trabalhos realizados sugerem que o comprimento do coleóptilo é eficiente para identificar genótipos de arroz tolerantes ao frio na germinação (BERTIN et al., 1996; STHAPIT; WITCOMBE, 1998). Este caráter é de fundamental importância para o estabelecimento da lavoura, pois o coleóptilo é o órgão que protege a plântula no momento de sua emergência, estendendo-se para cobrir a primeira folha jovem (OKUMOTO, 1997). De acordo com Luo et al. (2007), utilizando 12 cultivares de arroz submetidas a diferentes profundidades de semeadura, foi ressaltado que o comprimento do coleóptilo é fundamental para o estabelecimento da cultura.

Cruz e Milach (2004) observaram que a redução no comprimento do coleóptilo permite a identificação de genótipos tolerantes e sensíveis ao frio. Do mesmo modo, Nanculao et al. (2013) avaliou 20 genótipos de arroz chileno, os quais obtiveram redução no comprimento do coleóptilo em todos os genótipos avaliados.

Com relação ao desempenho relativo da raiz (DRcr) (Tabela 5), ocorreu a formação de 9 grupos. No grupo A observa-se que está formado por um genótipo (BRS 7 Taim) que se apresentou significativamente superior às testemunhas. Em contrapartida, o grupo B formado por 09 genótipos (Oryzica 1, BR IRGA 411, Ambar, Agulha Amarelo, Arroz Pássaro, BRA 051279, BRA 040304, Reetz) com comprimento da raiz significativamente igual à apresentada pela testemunha Brilhante (121), o DRcr que apresentaram os nove genótipos variaram de 31,18 até 25,60%, sendo que o desempenho relativo da testemunha é de 27,41%. Sete genótipos apresentaram DRcr superior a esta testemunha, sendo que um

genótipos obteve DRcr inferior 25,60%. 09 genótipos originaram o grupo C, com DRcr de 24,37 a 18,31%, que se apresentaram significativamente diferentes às testemunhas.

Posto isso, pode-se afirmar que um total de 08 genótipos foram melhores que a testemunha, sendo caracterizados como genótipos com desempenho superior quando submetidos ao estresse por frio nesta característica.

Um estudo utilizando 20 genótipos de arroz submetidos à temperatura de 15°C, demonstrou que a variável do comprimento de raiz não apresentou diferenças significativas entre os genótipos (BOSETTI, 2012). Em contrapartida, neste estudo a germinação seguida pelo comprimento da raiz foram as características que proporcionaram informações satisfatórias para a diferenciação de genótipos tolerantes ao frio. Além disso, analisando 400 famílias de mutantes submetendo a estresse por frio Da Luz (2011), observou-se que não foram apresentadas diferenças significativas entre as famílias quando comparadas com as testemunhas tolerantes.

Observando o comportamento da parte aérea, a porcentagem de redução da parte aérea e a porcentagem de redução do comprimento da raiz, utilizando 65 genótipos de arroz submetidos à temperatura de 13°C, pode-se concluir que estas características são as que mais contribuíram para caracterizar os genótipos com relação a tolerância ao frio entre os genótipos (SAVIO et al., 2011).

As respostas da raiz a estresses abióticos são de muita importância (GHOSH; XU, 2014). Isso porque o estresse causado pelas baixas temperaturas ocasionam mudanças fenotípicas, tais como alteração na membrana, rigidez na parede celular assim como a redução no comprimento da raiz (GOWDA et al., 2011; ATKINSON; URWIN, 2012).

No grupo D, 27 genótipos (21,77%), foram agrupados junto com as testemunhas Oro (122- tolerante) e IR8 (123- sensível), com DRcr que variam entre 17,33 até 10,11%, sendo que das testemunhas o DRcr foi 16,68% (122) e 12,33% (123). Como o genótipo Oro é caracterizado como tolerante ao estresse por frio, os genótipos encontrados acima desta testemunha são caracterizados como tolerantes ao estresse por frio. Fora isso, os 11 genótipos encontrados

abaixo do DRcr da testemunha são caracterizados como moderadamente tolerantes.

Tabela 5. Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz, agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do Desempenho relativo do comprimento da raiz (DRcr), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Desempenho relativo do Comprimento da Raiz (%)											
Grupo	Maior DRcr	Testem. DRcr	Menor DRcr	Identificação dos genótipos							
A	86,99		86,99	119							
B	31,18	27,41	25,60	118 81	69	50	31	93	97	32	121^a
C	24,37		18,31	26 113	60	90	39	108	87	18	27
D	17,33	16,68	10,11	74	117	19	122^b	64	111	88	120
		6		51	76	115	54	107	4	123^c	
		12,33		100 61	114 15	52 44	101	116	72	86	91
E	9,66	6,81	5,89	58 3	17 1	78 45	92 7	21 79	28 68	48 36	25 30
				56	124^d	104	80	75	55	85	13
F	6,07		3,04	89 96	34 57	71 103	20 42	24 53	67 94	23 83	12
G	3,58		1,74	106 82	16 5	59 62	40	77	47	29	65
H	1,98		0,59	109	37	98	14	112	2	110	11
				105	10	99	66	8	95		
I	0,36		0,00	41	63	49	46	73	33	84	38
				70	35	43	102	9	22		

*Genótipos pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5%

Tolerantes: a: **121** (Brilhante DRcc=27,41%); b: **122** (Oro DRcc= 16,68%);

Sensíveis: c: **123** (IR8 DRcc=12,33%); d: **124** (IRGA 410 DRcc=6,81%)

Do mesmo modo, quando observados com relação à testemunha sensível IR8 (123), 11 genótipos tiveram DRcr inferior variando de 12,33 a 10,11%, considerados como moderadamente sensíveis ao estresse por frio.

No entanto, observando o grupo E composto por 24 genótipos com desempenho relativo que variam entre 9,66 até 5,89%, estes apresentaram

comprimento da raiz significativamente igual à testemunha sensível BR IRGA 410 (124) com DRcr de 6,81%, sendo que, 17 genótipos apresentaram DRcr superiores a esta testemunha e seis genótipos, um DRcr inferiores, variando entre 6,66 a 5,89%. Sendo assim, podemos considerar estes genótipos como sendo sensíveis ao frio na germinação.

Quanto os demais grupos (F,G,H e I), estes foram significativamente inferiores às testemunhas sensíveis, podendo-se afirmar que estes grupos são classificados como sensíveis ao estresse por frio na geminação.

O estágio considerado mais sensível ao estresse por o frio é a embebição, processo que acontece durante a germinação. Yoshida (1981) descreveu que a temperatura tem uma maior influência sobre a germinação nas fases subseqüentes de ativação e crescimento do coleóptilo e radícula.

A redução no crescimento coleóptilo e radícula durante essas fases podem ser atribuídos ao efeito direto das temperaturas frias no alongamento celular e divisão, ou para o seu efeito indireto, levando a um desequilíbrio metabólico (LYONS, 1973). Trabalhos realizados por Sharifi e Aminpanah (2010) indicaram que a redução do coleóptilo assim como da radícula foram afetadas pela ação gênica não aditiva.

Através da construção de bibliotecas de DNA, Reddy et al. (2002) encontraram a expressão de muitas classes de quinases, indicando que a raiz é um importante órgão na percepção e na sinalização do estresse.

Quando observado o comportamento do desempenho relativo à parte aérea (DRcpa), ocorreu a formação de sete grupos (Tabela 6). O grupo A: formado por 15 genótipos (BRA 02665, BRA 050054, Reetz, Amarelinho, Tomoe Mochi, Agulha Amarelo, Arroz Pássaro, Supremo 02, SC 608, BRA 050106, AB 10004, Maravilha, BRS Colosso, EEA 405), com desempenho relativo da parte aérea significativamente igual à apresentada pela testemunha Brilhante (121) (DRcpa= 63,31%). Pode-se observar que 14 genótipos deste grupo apresentaram DRcpa inferior às testemunha a um mínimo de 40,07%. Em contrapartida, o grupo B foi formado por 15 genótipos, sendo que estes genótipos apresentaram desempenho

relativo significativamente inferior à testemunha Brilhante (121) ,mas superior às demais testemunhas, podendo ser caracterizado como genótipos tolerantes.

O grupo C formado por 22 genótipos teve o desempenho relativo da parte aérea (DRcpa) significativamente igual ao genótipo tolerante Oro (122) (Drcpa=23,08%), variando entre 32,44 e 20,48%, podendo-se observar que 12 genótipos tiveram DRcpa superior à testemunha e nove genótipos se apresentaram com DRcpa inferior. Dessa forma, para a variável DRcpa pode-se caracterizar aos grupos A, B e C, como tolerantes por estresse por frio.

No entanto, o grupo D foi formado por 20 genótipos que apresentaram DRcpa significativamente igual aos genótipos sensíveis ao frio IR8 (123) e BR IRGA 410 (124), com DRcpa de 17,22 e 16,88%, respectivamente. Neste grupo, cinco genótipos se apresentaram superiores à testemunha IR8, variando de 19,32 até 17,22%. De mesmo modo, três genótipos inferiores à primeira testemunha, mas superiores à BR IRGA 410 (124), sendo que 10 genótipos tiveram DRcpa inferior a ambas testemunhas.

Também foram formados os grupos E representado por 33 genótipos e o grupo F formado por 09 genótipos. Finalmente, o grupo G constituído por dez genótipos, obteve desempenho relativo dos grupos, variando de 12,49 a 0,00%, sendo que os três grupos tiveram o desempenho relativo da parte aérea significativamente inferiores aos das testemunhas. Assim, pode-se considerar que estes grupos estão formados por genótipos sensível ao estresse por frio.

Tabela 6. Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz, agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do Desempenho relativo do comprimento da parte aérea (DRcpa), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPeL-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Desempenho relativo do Comprimento da Parte Aérea (%)											
Grupo	Maior DRcpa	Testem. DRcpa	Menor Drcpa	Identificação dos genótipos							
A	63,31	63,31	40,07	121^a	113	108	81	61	90	31	93
				54	4	115	26	68	60	100	
B	40,11		29,79	50	51	119	103	7	69	87	32
				97	39	92	64	107	117	116	
C	32,44	23,08	20,48	57	101	96	118	23	12	88	15
				48	111	30	27	122^b	21	6	13
				76	86	74	44	78	55		
D	19,32	17,22	13,25	25	1	120	79	17	123^c	56	80
		16,88		114	124^d	52	45	28	72	3	18
				58	104	85	75				
E	12,49		3,92	91	94	65	71	106	89	20	24
				36	98	83	19	62	40	82	29
				16	59	95	77	11	10	5	42
				53	38	66	37	105	47	34	14
				2							
F	4,79		1,30	112	102	41	67	109	8	110	99
				63							
G	0,00		0,00	49	46	73	33	84	70	35	43
				9	22						

*Genótipos pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5%

Tolerantes: **a:121** (Brilhante DRcc=63,31%); **b: 122** (Oro DRcc= 23,08%);

Sensíveis: **c: 123** (IR8 DRcc=17,22%); **d: 124** (IRGA 410 DRcc=16,88%)

Para o caráter do desempenho relativo na germinação (DRgrm), o teste de Scott-Knott evidenciou a formação de seis grupos (Tabela 7). Foram formados dez grupos, demonstrando diferentes respostas frente ao estresse por frio, sendo que o grupo A formado por 26 genótipos foi significativamente igual ao genótipo tolerante Brilhante (121), com DRgrm que variou entre 120,34 à 83,71%. Do mesmo modo, neste grupo nove genótipos (EEA 405, Tomoe Mochi, Agulha, AB 10004, BRA 051279, BRS Sinuelo CL, Arroz Pássaro, Agulha Ligeiro, IAS 12.9 Formosa) tiveram DRgrm superiores, e, 16 genótipos (SC 173, IAC, Cica 9, BRA

02665, Agulhinha Dourado IPAM, SC 607, SC 608, AB 10006, YN 1905-WL 6221102114, Taquari, Agulhinha Anão, Progresso, Supremo 13, IRCTN China 1039, BR IRGA 413, Diamante) tiveram DRgrm inferiores à testemunha (DRgrm= 95,75%).

O grupo B, por sua vez, reuniu 17 genótipos com Drgrm, variando entre 81,66 à 63,51%. Neste grupo nenhuma testemunha foi agrupada, podendo considerar-se que os genótipos agrupados possuem uma boa resposta à germinação quando submetidas ao frio, mas inferiores às duas menores testemunha.

No entanto, 19 genótipos estão agrupados no grupo C, os quais apresentaram desempenho relativo na germinação significativamente igual ao apresentado pelas testemunhas Oro(122) e IR8(123), com DRgrm variando de 58,88 a 46,60%, sendo que os valores do desempenho relativo da germinação das cultivares controles foram 53,72 e 49,46%, respectivamente. Também pode-se observar que sete genótipos tiveram DRgrm superiores e oito inferiores à testemunha (122), sendo considerados como medianamente tolerantes na germinação. Por outro lado, quando observada a testemunha sensível IR8(123), dois genótipos tiveram um desempenho relativo da germinação inferior entre 49,46 à 46,60%. Observando o grupo D formado por 13 genótipos (10,48%), este foi significativamente diferente de todas as testemunhas, com DRgrm variando entre 40,33 à 29,35%, sendo consideradas como moderadamente sensíveis ao estresse por frio.

O grupo E, formado por seis genótipos (4,84%) com desempenho relativo na germinação significativamente igual à testemunha sensível BR IRGA 410 (124), apresentou variação de 25,43 até 21,23%, sendo que o DRgrm do genótipo testemunha foi de 25,43%. Além desses grupos, foram formados cinco grupos diferentes que apresentaram desempenho relativo na germinação significativamente inferior à todas as testemunhas utilizadas, formados pelo grupo F, composto por cinco genótipos(4,03%) com DRgrm entre 17,93 até 13,74%. Em contrapartida, o grupo G constituído por dez genótipos (8,06%) com desempenho relativo da germinação que variaram entre 12,68 até 8,60%. No entanto, sete

genótipos (5,65%) conformam o grupo H com valores entre 7,20 até 5,04%, o grupo I formado por dez genótipos (8,06%), o DRgrm encontrado neste grupo foi de 5,85% sendo o menor de 1,16%. O último grupo formado representado pelo J com 11 genótipos (8,87%), com as DRgrm variaram entre 0,61 até 0,00% de germinação.

Tabela 7. Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz, agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do Desempenho relativo na germinação (DRgrm), genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Grupo	Desempenho relativo da Germinação (%)										
	Maior DRgrm	Testem. DRgrm	Menor DRgrm	Identificação dos genótipos							
A	120,34	95,75	83,71	100	90	120	26	97	58	93	27
				52	121^a	116	67	66	113	18	101
				4	86	89	7	85	106	12	49
				30	80						
B	81,66		63,51	103	107	31	108	59	24	23	13
				46	73	119	15	111	91	77	62
				104							
C	58,88	53,72	46,60	3	50	118	78	16	117	29	122^b
				75	48	33	92	21	115	72	84
		49,46		123^c	51	1					
D	40,33		29,35	94	53	38	114	70	96	42	79
				55	54	25	88	6			
E	25,43	25,43	21,23	124^d	74	82	63	35	28		
F	17,93		13,74	11	95	19	69	43			
G	12,68		8,60	81	57	105	45	20	17	40	98
				87	76						
H	7,20		5,04	56	10	37	36	5	60	65	
I	5,85		1,16	110	109	8	2	102	64	14	39
				99	112						
J	0,61		0,00	61	68	32	44	71	83	34	47
				41	9	22					

*Genótipos pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5%

Tolerantes: a: **121** (Brilhante DRcc=95,75%); b: **122** (Oro DRcc= 53,72%);

Sensíveis: c: **123** (IR8 DRcc=49,46%); d: **124** (IRGA 410 DRcc=25,43%)

Os resultados mostram efeito significativo entre as variáveis avaliadas na fase de germinação para todos os genótipos. No entanto, a resposta dos genótipos ao estresse por frio foi diferente.

Quando observadas as quatro variáveis, analisadas um total de 14 genótipos (BRS 7 Taim , Arroz Pássaro, BRA 02665, Oryzica 1, AB 10004, Agulha Amarelo, Tomoe Mochi, Agulha Ligeiro, BRA 051279, Zebu, Arroz Chumbinho, Arroz Sequeiro, BRA 050106 e BRA 050054), encontraram-se sempre presentes nas quatro variáveis, consideradas como tolerantes ao estresse por frio, sendo que o genótipo BRS 7 Taim foi o que sempre se apresentou superior às testemunhas com relação às características DRcc e DRcr, podendo considerar este genótipo como genitor potencial para programas de melhoramento.

Temperaturas muito baixas ou muito altas poderão alterar tanto a velocidade quanto a porcentagem final de germinação. Os resultados encontrados por Steiner et al. (2009), que avaliou o efeito de diferentes temperaturas sobre a porcentagem de germinação de sementes de rabanete, evidenciaram que a temperatura influenciou negativamente a germinação de duas das cinco cultivares testadas.

Na Tabela 8, o algoritmo de otimização de Tuche distribuiu os genótipos em cinco grupos de similaridade, sendo que um genótipo (BRS 7 Taim) ficou sozinho em seu grupo (grupos V). Além disso, as testemunhas foram agrupadas nos diferentes grupos, grupo I (BR IRGA 410), grupo II (IR8 e Oro), grupo III (Brilhante). Assim, dez genótipos foram agrupados, formando o grupo IV.

Tabela 8. Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando as distâncias de Mahalanobis geradas a partir do DR das quatro variáveis avaliadas nos 124 genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.

GRUPO	Genótipos de arroz													
I	9	22	99	8	41	102	112	109	110	14	37	2	5	65
	10	105	40	98	47	20	36	56	83	34	71	11	95	45
	57	17	82	28	124	76	42	25	55	96	79	53	19	94
	114	74	6	88	1									
II	46	73	49	33	84	70	35	63	38	43	16	77	62	29
	59	66	24	89	106	85	67	3	75	80	13	23	78	30
	104	91	58	86	48	15	21	123	72	52	12	92	7	101
	107	111	116	122	103	117	27	18	120	51	115	4	100	113
II	26	93	97	90	31	121	108	50	118	54				
IV	61	68	44	64	39	60	32	87	81	69				
V	119													

*Genótipos utilizados como testemunhas estão identificadas em negrito.

Há relatos de interação significativa para características avaliadas em diferentes ambientes em germoplasma de painço (*Panicum miliaceum* L.) (*switchgrass*) para produção de biomassa (HOPKINS et al., 1995), de cevada para produtividade e componentes da produtividade (RODRIGUEZ et al., 2008), bem assim de arroz e características de grão (BRONDANI et al., 2006). A presença de interação sugere que a seleção de melhores genótipos para determinado ambiente deve levar em consideração características genotípicas, além de fatores do ambiente que determinam adaptação específica (RODRIGUEZ et al., 2008).

Na Tabela 9, as variáveis DRcpa e DRcc (0,67), DRcr e DRcc (0,61) apresentaram maior coeficiente de correlação significativa positiva ao nível de 5% de significância, seguidas pela correlação entre as variáveis DRcpa e DRcr (0,60).

Considerando o que foi exposto, pode-se especular que as variáveis DRcc, DRcr e DRcpa, podem ser utilizadas para discriminar genótipos tolerantes ao estresse por frio. Foi possível verificar que todas as variáveis avaliadas apresentaram correlações significativas positivas entre si, segundo a correlação de Pearson (Tabela 9).

Li et al. (1981) relataram uma correlação positiva significativa na tolerância ao frio entre a germinação e o estágio de plântula em arroz. Também, Zhuo et al. (2012), utilizando genótipos de retrocruzamento, a correlação e a tolerância ao frio entre a germinação e plântula, verificaram que foi significativa para esse caráter.

Tabela 9. Coeficiente de correlação de Pearson do Desempenho relativo (DR) entre as três variáveis: comprimento do coleóptilo, comprimento da raiz e comprimento da parte aérea, analisadas dos 124 genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Variáveis	DRcc	DRcr	DRcpa
DRcc	1	0,61*	0,67*
DRcr		1	0,60*
DRcpa			1

* Significativo ao nível de 0,05 de probabilidade de erro.

A análise de variáveis canônicas foi utilizada para resumir a informação contida nas quatro características avaliadas. As duas primeiras variáveis canônicas responderam por 96,15% da variação observada entre os genótipos (Tabela 10).

A primeira variável canônica totalizou 58,70% da variação obtida, sendo que as características com maior contribuição foram a do desempenho relativo da germinação e o comprimento da raiz, bem como as variáveis que menos contribuíram, que foram o comprimento da parte aérea e o comprimento do coleóptilo. A segunda variável canônica totalizou 31,83% da variação entre os genótipos, totalizando 90,52%.

Tabela 10. Autovalores, percentuais e acumulação das variáveis canônicas obtidas de 124 genótipos de arroz, submetidas ao estresse por frio. Embrapa/FAEM/UFPeL-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Variáveis Canônicas	Variância		
	Autovalores	Percentual	Percentual Acumulado
VC1	18,82	58,70	58,70
VC2	10,20	31,83	90,52
VC3	1,80	5,62	96,15
VC4	1,23	3,85	100,00

Para uma interpretação satisfatória da variabilidade encontrada entre os genótipos, é necessário que as duas primeiras variáveis canônicas permitam estimativas mínimas de 80% da variação total contida no conjunto de caracteres (CRUZ et al., 2004). Tendo em vista que as duas primeiras variáveis canônicas demonstraram mais de 80% da variância total de caracteres analisados (90,52% a variância total acumulada), é possível explicar de maneira satisfatória a variabilidade manifestada entre os genótipos considerados nesta avaliação, tornando possível a análise gráfica da distribuição dos genótipos, considerando-se o seu posicionamento conforme os escores das duas primeiras variáveis canônicas (Figura 1).

Os grupos formados por meio da dispersão gráfica dos escores obtidos pela distância de Mahalanobis (Figura 1), seguem a mesma tendência dos grupos obtidos pelo método de otimização de Tocher (Tabela 8), reafirmando, desta forma, que o uso dessa metodologia auxilia na visualização da variabilidade pela análise multivariada.

Foi possível observar uma separação entre os genótipos tolerantes e sensíveis ao estresse por frio em relação aos outros genótipos que foram caracterizados como moderadamente tolerantes e sensíveis, os genótipos tolerantes foram agrupados próximo da testemunha considerada como tolerante (Brilhante), sendo agrupadas todas elas no quadrante superior do gráfico.

Segundo Benitez et al. (2011), a utilização de análises multivariadas são eficientes para a discriminação dos indivíduos, permitindo agrupá-los de forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Do

mesmo modo, Hoogerheide (2009) observou diferentes padrões de agrupamento em acessos de alhos avaliados em diferentes ambientes.



Figura 1. Distribuição de 124 genótipos com os quatro genótipos (testemunhas) identificados para as duas primeiras variáveis canônicas (VC1 e VC2), cada cor representa um grupo diferente, preto (genótipos desconhecidos), vermelho (*indica*), verde (*japonica temperado*) e turquesa (*japonica tropical*). Embrapa/FAEM/UFPeL-CGF, Pelotas-RS.

3.3.1 Recrescimento do coleóptilo (RCOL)

Quando analisados os dados do experimento II referentes ao recrescimento do coleóptilo (RCOL), os resultados obtidos relativos a essa variável revelaram uma grande amplitude de valores, apresentando diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para essa característica nos 124 genótipos (Tabela 11).

Tabela 11. Resumo da análise de variância do desempenho relativo dos caracteres de recrescimento do coleóptilo (RCOL), avaliados em 124 genótipos de arroz. Embrapa/FAEM/UFPeL-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio
		RCOL
Genótipos	123	0,07*
Resíduo	372	0,09
Média Geral	–	0,42
CV (%)	–	22,74

*Valores significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.
GL= graus de liberdade.

Na análise de Scott-Knott a 5% (Tabela 12), foi possível verificar que ocorreu resposta diferenciada dos genótipos conforme ao estresse por frio no RCOL, podendo-se observar a formação de cinco grupos. Os genótipos do grupo A apresentaram RCOL variando de 0,57 a 0,31cm. Um grupo formado por 17 genótipos, incluindo as testemunhas Brilhante (121) e Oro (122), procedente do grupo *japonico*, que apresentam maior RCOL que as do grupo *indica*. Resultados similares foram obtidos no experimento I, onde o genótipo do grupo *japonico* se apresentou com melhor resultado, podendo-se afirmar que estes genótipos quando avaliado o RCOL, apresentaram um elevado recrescimento do coleóptilo.

O grupo B formado por 49 genótipos apresentaram médias semelhantes às testemunha sensíveis IR8 (123) e BR IRGA 410(124), variando entre 0,31

até 0,18cm. No entanto, as testemunhas apresentaram médias de 0,30 e 0,20cm, sendo que neste grupo foi verificado um recrescimento intermediário. Esses resultados demonstram que posteriormente ao período do frio, a retomada do processo de germinação variou entre os genótipos.

Também foram formados três grupos que se apresentaram significativamente diferentes às testemunhas utilizadas, o grupo C, D e E. O grupo C foi formado por 40 genótipos com médias entre 0,23 até 0,10cm, o grupo D formado por 16 genótipos com médias variando entre 0,08 e 0,04cm. Já o grupo E, representado por dois genótipos, apresentaram médias iguais a 0,00cm, não apresentando recrescimento do coleóptilo quando submetidos às variações de temperatura, podendo considerar-se que esses genótipos apresentaram-se altamente sensíveis ao estresse por frio.

Sendo assim, a análise desta característica não possibilita a separação das três subespécies de arroz.

Tabela 12. Representação dos grupos dos 124 genótipos de arroz, agrupados em ordem decrescente, estabelecidos para a variável do recrescimento do coleóptilo (RCOL), genótipos utilizados como testemunhas estão identificados em “negrito”. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Re-crescimento do coleóptilo											
Grupo	Maior RCOL	Testem. RCOL	Menor RCOL	Identificação dos genótipos							
A	0,57	0,46	0,31	9	74	28	104	89	121^a	27	50
				120	65	39	67	36	2	122^b	80
		0,34		37							
B	0,31	0,30	0,18	18	34	81	123^c	41	91	111	85
				92	109	100	15	48	31	38	45
				33	70	26	101	77	105	107	97
		0,20		49	57	79	61	60	62	98	52
				116	1	69	76	53	11	55	66
				94	124^d	93	96	56	95	47	87
				68							
C	0,23		0,10	22	13	7	102	110	8	20	40
				24	114	99	6	12	16	42	58
				35	5	54	23	46	75	86	88
				73	3	59	29	103	117	64	71
				10	78	90	108	63	118	82	30
D	0,08		0,04	14	83	112	25	51	72	113	32
				115	19	106	44	17	119	4	21
E	0,00		0,00	43	84						

*Genótipos pertencentes ao mesmo grupo não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott, a 5%

Tolerantes: a: **121** (Brilhante RCOL=0,46cm); b: **122** (Oro RCOL= 0,34cm);

Sensíveis: c: **123** (IR8 RCOL=0,20cm); d: **124** (IRGA 410 RCOL=0,39cm).

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que entre os genótipos estudados do banco de germoplasma da Embrapa, existe ampla variabilidade genética, assim como diferentes respostas à variações do ambiente e características desejáveis agronomicamente. Assim, alguns genótipos possuem potencial para serem utilizados na ampliação da base genética em programas de pré-melhoramento e melhoramento da cultura.

Os genótipos que se apresentaram com tolerância ao frio com base nas avaliações foram BRS 7-Taim, Oryzica1, BR IRGA 411, Ambar, Agulha Amarelo, Arroz Pássaro e BRA 051279, além das testemunhas Brilhante e Oro, sendo consideradas como genitores potenciais para transferência da tolerância ao frio para genótipos adaptados da subespécie *indica*.

As características de desempenho relativo do coleóptilo e da raiz são as variáveis que mais contribuem para a diferença entre estas cultivares neste estudo.

Para a característica de recrescimento do coleóptilo (RCOL), os genótipos que apresentaram elevado recrescimento foram do grupo *japonica*.

4. CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM GERMOPLASMA DE ARROZ UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES SSR

3.1 INTRODUÇÃO

O rápido aumento da população mundial está gerando uma crescente demanda por alimentos e matéria prima, induzindo a necessidade de aumentar os atuais níveis de produtividade dos principais cereais, como é o caso do arroz (*Oryza sativa* L.). Esta cultura ocupa posição de destaque entre os cereais cultivados e é o principal alimento para mais da metade da população mundial, tendo um papel fundamental nas políticas públicas de produção e distribuição de alimentos (segurança alimentar) (FAN, 2011).

Os recursos genéticos do gênero *Oryza* incluem espécies silvestres, híbridos naturais entre o arroz cultivado e espécies silvestres, cultivares comerciais, variedades tradicionais, híbridos, mutantes e linhagens de programa de melhoramento genético (CHANG, 1992), totalizando mais de 100.000 genótipos no mundo (SANTOS et al., 2006).

Enquanto a maior parte do arroz produzido vem de variedades modernas altamente produtivas, variedades tradicionais mantidas em bancos de germoplasma têm grande importância como recursos genéticos para ampliação da base genética em programas de melhoramento. Essas variedades tradicionais são valiosos recursos por conterem variabilidade genética e, ao mesmo tempo, complementarem o *pool* gênico das cultivares melhoradas recentemente. Elas representam um estágio intermediário da

domesticação dos ancestrais silvestres e as variedades modernas, e servem de reservatório da variabilidade (LONDO et al., 2006).

O arroz irrigado no Brasil é constituído na maior parte da base genética dos programas de melhoramento até pouco tempo por sete variedades, quais sejam, Deo Geo Woo Gen, Cina, Lati Sail, I Geo Tze, Mong Chim Vang A, Belle Patna e Tetep (RANGEL et al., 1996, NASCIMENTO, 2008), sendo que o arroz é uma das espécies, em pesquisa, mais intercambiadas em todo o mundo. Porém Montalván et al. (1998) alertaram sobre o estreitamento da base genética das cultivares modernas de arroz, fazendo-se necessário priorizar a conservação, bem como melhorar a manutenção e utilização dos banco de germoplasma.

Acredita-se que as duas subespécies de arroz, *indica* e *japonica*, são produtos de separados eventos de domesticação de *Oryza rufipogon* Griff. Essa evidência vem de estudos de características bioquímicas (SECOND, 1982) e esterilidade de híbridos e confirmada por análises moleculares (CHENG et al., 2003), especialmente análises evolucionárias de alguns genes com influência na domesticação (LI et al., 2006; KONISHI et al., 2006). Garriss et al. (2005), usando análises de estrutura populacional, dividiu *O. sativa* em cinco grupos distintos: *indica*, *japonica* temperado, *japonica* tropical, Aromático e *Aus*.

Dentre os objetivos principais dos programas de melhoramento, encontram-se o desenvolvimento de novas cultivares para a utilização de conhecimento na área molecular e genética, permitindo gerar e selecionar variedades superiores (ARNOA et al., 2010). No Brasil, os programas de melhoramento de arroz sequeiro vem estudando o ganho genético para a produtividade de grãos. Os dados demonstram uma redução nos ganhos, indicando que novas alternativas de melhoramento devem ser empreendidas (BRESEGHELLO et al., 2006).

No melhoramento do arroz é utilizada uma porção da variabilidade genética presente na cultura (MARTÍNEZ et al., 2003). Zhu et al. (2007) estimou que o arroz cultivado contém aproximadamente 25% da variabilidade genética de seus progenitores silvestres, apresentando uma forte erosão genética, sendo esse um problema de grande importância para o

melhoramento vegetal, já que o mesmo necessita de variabilidade genética para obtenção de genótipos superiores (DA SILVA, 2006).

As variedades tradicionais de arroz são mantidas tanto pela capacidade de adaptação ao ambiente quanto pela seleção feita por produtores que determinam quais variedades são cultivadas a cada ano, diferentemente das populações selvagens de arroz que se disseminam conforme a habilidade de sobreviver e competir sob condições naturais. Além disso, populações naturais tendem a ser mais estáveis do que cultivares em suas distribuições geográficas, pois as forças da seleção natural geralmente levam a mudanças graduais no decorrer do tempo (THOMSON et al., 2009).

As informações sobre a variabilidade e estrutura das populações são essenciais para a seleção de características importantes para a realização de cruzamentos, expandindo o número dos genes para identificar genótipos que contém alelos de importância para o melhoramento de plantas (GARRIS et al., 2005). Essa variabilidade expressa-se, entre outras formas, no grande número de variedades que as espécies cultivadas apresentam (MÜHLEN et al., 2000).

Informações que são obtidas através da variabilidade genética com o uso de marcadores moleculares gerando grande quantidade de dados, que combinadas com informações do “*pedigree*” assim como com características morfológicas, fisiológicas e agronômicas, ajudam a fornecer uma análise mais completa (FALEIRO et al., 2004).

Utilizando descritores e marcadores moleculares, a busca por genes que contribuem para características de interesse agrônomo também é importante para a efetiva utilização dos recursos genéticos em programas de melhoramento (BOSETTI, 2012). As características morfológicas são fundamentais no melhoramento aplicado e é por isso que são muito usadas na caracterização de variabilidade genética (MULATO, 2009).

Vários trabalhos que avaliam a variabilidade e a distância genética utilizando características morfológicas e marcadores moleculares foram realizados nos últimos anos (BERTINI et al., 2010), motivo pelo qual a variabilidade genética, utilizando marcadores moleculares para o estudo de diversas características, permite o conhecimento de melhores combinações de híbridos, viabilizando a obtenção de genótipos superiores em gerações segregantes (BENITEZ et al., 2011).

Na avaliação da variabilidade genética, os marcadores microssatélites tem sido utilizados com sucesso e são considerados ideais para a caracterização molecular de recursos genéticos por serem marcadores co-dominantes, abundantes, multialélicos e altamente polimórficos, com grande eficiência (VARSHNEY et al., 2005). Em trabalhos realizados, McCouch et al., (2002), destacou que existem mais de 2000 marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos para esta espécie. Por exemplo, em estudos de variabilidade alélica, tem sido documentado mais de 25 alelos por *locus* entre diferentes acessos de arroz cultivado (McCOUCH et al., 2005). A caracterização e avaliação do germoplasma auxiliam na identificação e exploração da variabilidade genética da cultura do arroz.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo estimar a variabilidade genética de diferentes genótipos de arroz disponíveis no Banco de germoplasma da Embrapa.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Germoplasma

Foram utilizados no estudo 151 genótipos de arroz pertencentes ao Banco Ativo de germoplasma da Embrapa (Anexo 2).

4.2.2 Extração de DNA e Genotipagem com Marcadores SSR

As sementes dos 151 genótipos foram semeadas em “gerbox” e colocadas para germinar em câmara de germinação (BOD) a uma temperatura de 25°C. Sete dias após a germinação, foram coletadas amostras do tecido folhar para extração de DNA genômico.

As extrações de DNA foram realizadas utilizando o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), mas com algumas modificações. A concentração das amostras de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1% por comparação com o Marcador Lambda/ Hind III (Invitrogen) de peso molecular conhecido, tendo sido as amostras diluídas para a concentração de 10 ng/μl.

A seleção dos marcadores microssatélites foi realizada baseada no *Polymorphism Information Content* (PIC) de cada *loci*, tamanho de amplificação e distribuição, considerando os nove cromossomos do arroz. Foram selecionados nove *loci* microssatélites (TEMNYKH et al., 2000) sendo, posteriormente, analisados, conforme metodologia proposta (Zhu et al., 2004; WANKHADE et al., 2010; RAJENDRAN et al., 2012) (Tabela 1). Além disso, foi adaptado um iniciador CACGACGTTGTAAAACGAC (M-13) na sequência *Forward* de cada conjunto de *primers*.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12μL, contendo cada amostra 2,0μL de DNA genômico (10ng/μL); 2,0μL do *primer* (*forward* com iniciador M-13 e *reverse*) (Invitrogen) na concentração de 1,0μM; 6,5μL do mixGoTaq Green Master (Promega) e 1,5μL de água ultrapura. A amplificação do *primer* ocorreu 20 pb da região de amplificação, devido ao uso do iniciador M-13 adaptado na sequência *Forward* do *primer*.

O programa de amplificação foi executado em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*), Sendo construído de um

ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, anelamento de 55°C à 61°C por 1 minuto, conforme a temperatura ideal de cada *primer* (Tabela 1), finalizando com uma extensão a 72°C por 5 minutos.

A checagem da amplificação foi feita por eletroforese horizontal em gel de agarose 3% utilizando λ DNA/Hind λ III Fragments. Para a detecção de polimorfismo alélico foi efetuada em géis desnaturantes de poliacrilamida a 6%, contendo 7M de uréia e tampão TBE 1X. Os produtos amplificados foram visualizados através de coloração do gel com nitrato de prata e o tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado comparando-se sua posição no gel em relação à posição das bandas de tamanho definido de um marcador padrão de peso molecular de *10pb DNA Ladder* (Invitrogen).

Tabela 1. Descrição dos nove *loci* SSR utilizados na genotipagem dos 151 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.). Embrapa Clima Temperado, UFPel/CGF/Pelotas, 2015.

<i>Locus</i>	Cr.	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	PIC	T(°C)	Referencia
RM341	2	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC	0,66	55	McCOUCH et al., 2002
RM157A	3	CCTCCTCCTCACGAATCCCGCC	GGGCTTCTTCTCCGCCGGCTTC	0,72	55	TEMNYKH et al., 2000
RM161	5	TGCAGATGAGAAGCGGCGCCTC	TGTGTCATCAGACGGCGCTCCG	0,64	61	McCOUCH et al., 2002
RM103	6	CTTCCAATTCAGGCCGGCTGGC	CGCCACAGCTGACCATGCATGC	0,70	55	McCOUCH et al., 2002
RM172	7	TGCAGCTGCGCCACAGCCATAG	CAACCACGACACCGCCGTGTTG	0,56	55	McCOUCH et al., 2002
RM152	8	GAAACCACCACACCTCACCG	CCGTAGACCTTCTTGAAGTAG	0,75	55	McCOUCH et al., 2002
RM184	10	ATCCCATTGCGCAAACCGGCC	TGACACTTGGAGAGCGGTGTGG	0,66	55	McCOUCH et al., 2002
RM286	11	GGCTTCATCTTTGGCGAC	CCGGATTCACGAGATAAACTC	0,72	55	McCOUCH et al., 2002
RM19	12	CAAAAACAGAGCAGATGAC	CTCAAGATGGACGCCAAGA	0,82	55	McCOUCH et al., 2002

PIC: descritos pelos autores que desenvolveram os marcadores.

T: temperatura de anelamento utilizado.

Cr: Cromossomo.

4.2.3 Análise dos dados

A análise de correspondência múltipla (MCA) foi realizada nos dados da distância genética, utilizando PROC CORRESP (SAS Institute, 2000).

A análise da estrutura do germoplasma foi feita por meio de análise Bayesiana, utilizando o software STRUCTURE versão 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000). Esta análise utiliza um método de agrupamento que identifica K grupos de genótipos com frequências alélicas distintas, assumindo que há equilíbrio de Hardy - Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os *loci* analisados no germoplasma. Os acessos podem ser membros de múltiplos subgrupos com um coeficiente diferente, sendo a soma destes igual a 1.

O programa foi executado com uma predefinição de número de grupos (K) variando de 1 a 10 e vinte simulações independentes para cada K, usando o modelo de combinação que utiliza a correlação das frequências alélicas entre os agrupamentos (K) e ancestralidade comum (*Oryza sativa* L.) entre os acessos. Cada simulação teve um período de *burn-in* de 10.000, seguido de 100.000 interações.

A determinação do número K mais provável em relação aos propostos foi feita utilizando o método de Evanno (2005), implementado no aplicativo STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2014).

4.2.4 Distribuição da variabilidade genética

A análise de variância molecular (AMOVA) foi calculada com auxílio do programa GENES (CRUZ, 2006), tendo como base a classificação dos três grupos, quais sejam, *indica*, *japonica* e genótipos sem classificação. Pela AMOVA, com base na matriz de distância Euclidiana entre os pares de genótipos, foi estimada a proporção da variação total encontrada entre e dentro dos subgrupos (EXCOFFIER et al., 1992).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Frequência genotípica para marcador SSR

Um total de 41 alelos foram detectados com os nove marcadores SSR nos 151 genótipos estudados. O número de alelos por *locus* variou de dois (RM 184) a sete (RM 157 A), com uma média de 4,55 alelos por *locus*. Este valor foi superior às médias observadas por diferentes autores ao analisarem acessos de *Oryza sativa*, com médias entre 3,46 alelos por *locus* (RABANNI et al., 2010), 2,03 (RAJENDRAN et al., 2012) e 2,87 (DAS et al., 2013), provavelmente por utilizarem um grande número de genótipos, assim como maior número de marcadores SSR, sendo, assim, consistente com a expectativa de que as variedades mostradas em determinada região geográfica seriam menos diversas, visto que são oriundas e cultivadas em grupos de ambientes similares, enquanto que o germoplasma oriundo de uma ampla gama de regiões diferentes geograficamente irá conter maior variabilidade genética devido a diferentes pressões de seleção.

Como esclarecimento alternativo, em estudos em escala global, com maior ênfase na inclusão de variedades diferentes nos subgrupos de germoplasma com finalidade de representar um maior número de regiões, a variabilidade observada nos acessos japoneses também é menor do que a encontrada em um conjunto de 309 acessos, incluindo variedades melhoradas e tradicionais da Indonésia, avaliadas com 30 marcadores SSRs (THOMSON et al., 2007).

Os alelos obtidos nos diferentes *loci* e os seus respectivos número de genótipos podem ser visualizados na Tabela 2. O *locus* RM 157A detectou o maior número equivalente a sete alelos no conjunto de genótipos em estudo, seguido por RM 286 com seis alelos, enquanto o menor número foi detectado em RM 184, com apenas dois alelos diferentes identificados.

Os alelos mais frequentes neste estudo foram detectados nos *loci* RM 184 (232pb), RM 161 (196pb), RM 172 (185pb) e RM 341 (190pb). No entanto, sete alelos (17,07%) apresentaram alelos poucos frequentes por genótipos RM 341 (178bp), RM 157A (147 e 162pb), RM 161 (196pb), RM 103 (359pb), RM

152 (154pb) e RM 286 (152pb), variando de oito a um genótipo por *locus* SSR (Tabela 2).

Os genótipos que apresentaram um alelo foram detectados nos *loci* RM 157A e RM 286. Os genótipos que apresentaram esse alelo foi o Mogi e Oro. O motivo disso pode ser que o genótipo Oro é uma linhagem pura com genitores desconhecidos, tendo em vista que relatos sobre esta cultivar ressaltam que foi selecionada a partir de arroz que era semeado inicialmente no Chile, sendo que sua origem está, provavelmente, nas primeiras variedades introduzidas da Europa (AGIRRE, et al., 2005). Diferente do genótipo Mogi, que o ancestral dele provém de variedades Dee Geo Woo Gan e Preta, podendo mostrar-se esses alelos raros possivelmente por apresentarem uma estreita relação entre eles.

Os alelos infrequentes nos 151 genótipos foram observados apenas no *locus* RM 157A que mais distinguiu, apresentando-se em três alelos cada, seguido por um alelo nos *loci* RM 341, RM 161, RM 103, RM 152, e RM 286 (Tabela 2). Podendo ser considerados como introduções ou cultivares mais antigas, provavelmente pouco utilizadas em cruzamentos nos programas de melhoramento por possuir algumas características desfavoráveis.

O genótipo que apresentou mais alelo para cada loco foi de 77% (RM 184, RM 161), apresentados em 117 genótipos. Em média, 77% dos 151 genótipos de arroz compartilharam um mesmo alelo neste *locus*.

Tabela 2. Tamanho de alelo (TA) e número de genótipos (N° G) observados nos 151 genótipos analisados, para os nove *loci* SSR. Embrapa Clima Temperado, UFPel/CGF/Pelotas, 2015.

Alelos	CR 2		CR 3		CR 5		CR 6		CR 7		CR 8		CR 10		CR 11		CR 12	
	RM 341		RM 157A		RM 161		RM 103		RM 172		RM 152		RM 184		RM 286		RM 19	
	TA	N° G	TA	N° G	TA	N° G	TA	N° G	TA	N° G	TA	N° G	TA	N° G	TA	N° G	TA	N° G
A	153	95	135	4	195	117	343	18	179	17	154	6	232	117	119	77	259	49
B	161	34	144	44	196	4	346	75	185	111	160	11	239	63	133	10	261	80
C	178	6	147	8	199	35	350	44	182	40	165	53			137	20	264	33
D	186	19	148	21	204	13	354	18			168	15			138	29	282	10
E	190	106	153	57			359	3			154	6			146	27		
F			160	23											152	1		
G			162	1														
Total de alelo		260		158		169		158		168		167		180		164		172

Cr: Cromossomo.

N° de genótipos: N°G

4.3.2 Análise de correspondência múltipla (MCA)

Na análise de correspondência múltipla (MCA) (Figura 1), nota-se que as dimensões representaram grande variabilidade genética. Observa-se que no quadrante I do gráfico há um menor agrupamento dos genótipos entre as dimensões entre -0.2 a 0, sendo preferencialmente genótipos *indica*, 10 genótipo *japonica* temperado e dois genótipos *japonica* tropical, antigas sem seleção no Brasil, totalizando, quatro genótipos *indica* da Colômbia (Cica 4, Cica 7, Cica 9, Cica 8), e três genótipos das Filipinas (IRCTN SKAN 23, IRCTNK 3006-1-1-1-2, IR8 e IRCTN China 1039).

No mesmo quadrante, podem ser observadas duas linhagens que são localizadas muito próximas a BRA 050108 e a BRA 050106. Isso ocorre pois ambas são irmãs e possuem algum genitor próximo entre elas. Esses genótipos apresentam características de tolerância ao frio, possivelmente podendo ser utilizados hoje em dia para obter genótipos tolerantes ao estresse por frio. Corroborando com outros estudos, foi observado que entre os genótipos japoneses a grande maioria é pertencente ao subgrupo *japonica*, possuem certa tolerância ao estresse por frio (ALI et al., 2011).

Sendo assim, a importância destes genótipos é de que aproximadamente 90% dos genótipos desenvolvidos no Brasil vêm de progenitores procedentes, basicamente, da Colômbia, como são Cica 4, Cica 7, Cica 9, Cica 8, Metica1 e Oryzica1, assim como um genótipo considerado importante, procedente das Filipinas como é o IR8. Genótipos utilizados comercialmente e divulgados pela Embrapa, Epagri, IRGA e Syngenta possuem alelos do genótipo IR8 ou descendem do mesmo (RAIMONDI et al., 2014).

Além disso, Acevedo et al, (2007), ressaltou que, de maneira geral, na América Latina 36% dos genes dos genótipos utilizados comercialmente provém dos ancestrais do genótipo IR8, sendo que aproximadamente 14 ancestrais contribuem com aproximadamente 70% dos genes, incrementando, assim, o parentesco entre eles. O maior aporte deste genitor é provável que esteja relacionado ao sistema do arroz inundado utilizado no país, o qual exige uma alta tolerância ao acamamento, sendo que este genótipo possui o gene de plantas semi-anãs, assim como resistência ao acamamento.

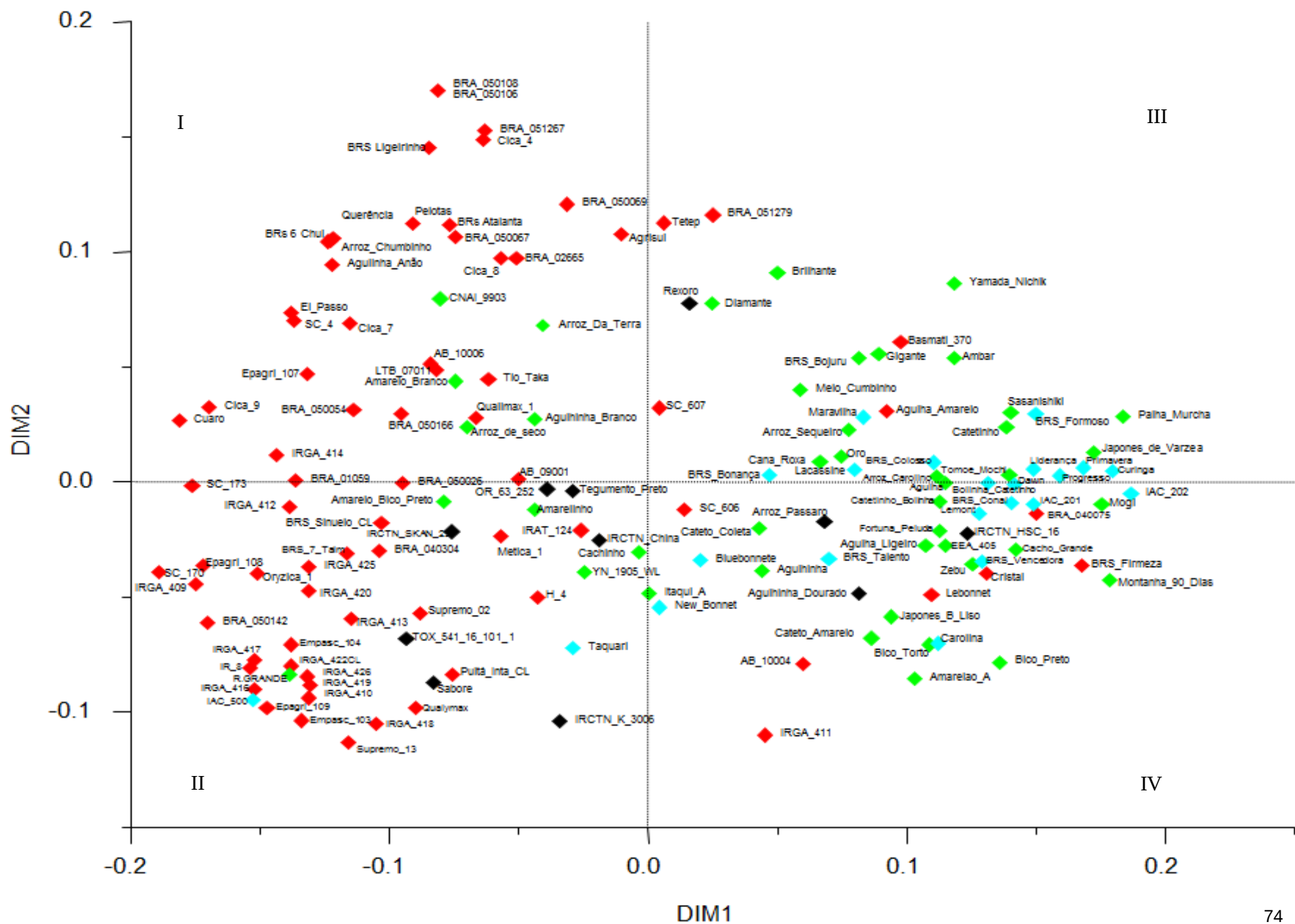


Figura 1. Análise de correspondência múltipla (ACM) dos 151 genótipos de arroz, a partir de nove *loci* SSR, os grupos foram indicados como vermelho (*indica*), verde (*japonica* temperado), turquesa (*japonica* tropical) e preto (genótipos desconhecidos). Embrapa/CGF/ UFPel, 2015.

Foram observados, também, quatro genótipos (New Bonnet, Itaquí-A, Cachinho, SC 607) que são encontrados próximos ao eixo de origem. Estes genótipos pertencentes ao grupo *japonica* tropical apresentam genitores dos EUA e Brasil, assim como também são genótipos que não estão sendo utilizados comercialmente hoje em dia, sendo que não formam parte das genealogias dos genótipos utilizados atualmente.

No quadrante II, os genótipos apresentaram-se mais espalhados dentro de todo o quadrante, representados, também, por uma grande variabilidade de genótipos procedentes de diferentes locais e formados, principalmente, pelos grupos *indica* e alguns genótipos do grupo *japonica* temperado. Neste quadrante, também podem ser observados genótipos de muita importância, como é o caso do BR IRGA 409, Metica1, Oryzica1 e IR8. Estes genótipos são utilizados na atualidade como progenitores.

De acordo com Raimondi et al. (2014), a cultivar IR8 foi lançada durante o período da “revolução verde”, sendo utilizada normalmente como fonte de características para plantas semi-anãs. Várias companhias de todo o mundo tem procurado genótipos que utilizem este genótipo como fonte de genes para aumentar o rendimento. O agrupamento próximo deste genótipo é devido a estreita base genética entre eles.

Outrossim, são encontrados genótipos de importância e utilizados atualmente, como é o caso dos genótipos BRS Sinuelo CL e Puita Inta CL, que correspondem a 1,26% e 41,44% da produção total no Rio Grande do Sul, dados obtidos no período de 2013/2014 (IRGA, 2014).

De modo análogo, no quadrante III, os genótipos pertencentes ao quadrante superior, Yamada Nichik procedente do Japão e do grupo *japonica* temperado apresentou-se mais isolada com relação aos outros genótipos, possivelmente por apresentar alguma característica não conhecida que seja atualmente de interesse.

Com o intuito de aumentar a informação disponível sobre o genoma de arroz, Arai-Kichise et al. (2014) selecionou e analisou o genoma completo de seis genótipos, entre eles Yamada Nichik, utilizando Nippombare como referência, proporcionando, assim, informações importantes de *SNPs* para avanço da investigação de análises do genoma do arroz.

Nota-se que da mesma forma, o Diamante e Rexoro apresentaram a mesma distância genética. Isso pode ter ocorrido devido ao fato que o Rexoro foi utilizado como genitor para a obtenção do genótipo Diamante. Sendo assim, no processo de mapeamento, a escolha do germoplasma a ser utilizado é fundamental, pois quanto maior for a distância genética entre os genitores que darão origem à população a ser mapeada, maior a chance de serem detectados polimorfismos ao nível de DNA (MILACH, 1998; CRUZ et al., 2007). Por sua parte, o Diamante é o progenitor de mais ampla genealogia entre os genótipos da INIA, com progenitores como a Quila 64129 50% e Brilhante 50% (AGIRRE et al., 2005).

Podem ser observados três genótipos que ficaram afastados, o Tetep, BRA 051279 e o Brilhante. Estes genótipos são utilizados por melhoristas como genitores paternos (SILVA et al., 1999; AGIRRE et al., 2005). O quadrante III está formado, em sua maioria, por genótipos do grupo *japonica* temperado, cinco genótipos do grupo *indica* e nove *japonica* tropical, sendo que neste quadrante encontram-se genótipos de importância para o melhorista, sendo que o BRS Bojuru é uns dos poucos genótipos utilizados atualmente no mercado nacional. No período de 2013/2014, foi semeado só no Rio Grande do Sul correspondendo a 0,01% da produção total (IRGA, 2014).

Outro genótipo que foi agrupado neste mesmo quadrante, sendo considerado de importância para os programas de melhoramento, é o genótipo Oro, sendo que entre os principais genitores do programa de melhoramento de arroz da INIA são encontrados os genótipos Oro e Diamante. O Oro foi selecionado a partir do arroz, semeado inicialmente no Chile, com origens prováveis das primeiras variedades introduzidas na Europa (AGIRRE et al., 2005).

Com referência ao agrupamento de genótipos formado no último quadrante IV, constituído principalmente por genótipos *japonica* temperado, sete genótipos *indica*, nove genótipos *japonica* tropical e três genótipos

desconhecidos, de procedência brasileira, japonesa, americana assim como genótipos de procedência desconhecida, do total destes genótipos agrupados, só um, BRS Firmeza, é utilizado atualmente no mercado. Entretanto, no período de 2013/2014 não foi semeado em nenhuma das regiões do Rio Grande do Sul (IRGA, 2014).

Pode-se observar, portanto, que o genótipo Bico Preto do grupo *japonica* temperado ficou mais afastado devido a eles serem genótipos antigos. Algumas variedades antigas como é o caso do Bico Preto tem sido utilizada em diversos programas de melhoramento genético (MAGALHÃES JUNIOR, 2007).

Do mesmo modo, o genótipo IRGA 411 pertencente ao grupo *indica* encontra-se neste grupo, sendo que este se apresentou mais isolado dos demais genótipos porque foi agrupado neste quadrante por causa que um dos seus progenitores é o genótipo Dawn, localizado no mesmo quadrante. Em análise de genealogia realizada por Raimondi et al. (2014), foi observado um nível significativo de parentesco do IRGA 411 entre os genótipos comerciais de arroz lançados pela Embrapa e IRGA.

Outros genótipos de interesse encontrados neste quadrante são o Lemont e o Bluebonnet, o Lemont tem como característica que um dos genitores deste genótipo é o Bluebonnete, o Lemont é considerado um das principais cultivares nos EUA (AGIRRE et al., 2005).

Considerando-se esses aspectos, é possível levantar a hipótese de que a estruturação genética no Banco Ativo de germoplasma da Embrapa, detectada pelos marcadores moleculares, esteja detectando um isolamento geográfico entre os genótipos analisados, o que pode estar associado à características dos genitores que não estejam sendo utilizadas na atualidade.

Porém, outras avaliações, incluindo mais *locus* SSR, devem ser realizadas para a confirmação ou não dessa hipótese, pois existe a possibilidade desses genótipos estarem já descartados do melhoramento. Esta informação pode ser importante para a prospecção de genes, em programa de melhoramento genético que obterem cultivares com maiores interesses para o mercado. Isso, sobretudo com o intuito obter maior variabilidade para os caracteres de interesse.

4.3.3 Análises de agrupamento e estrutura populacional

Com base aos 151 genótipos de arroz, foram avaliados quanto à estratificação da população. Os dados foram analisados sucessivamente aumentando o número de subpopulações (K) de 1 a 10. Os valores de K que melhor representou o conjunto de genótipos analisados, baseados na estatística do ΔK de Evanno et al. (2005) apresentaram um pico maior para K = 2, permitindo reconhecer inicialmente as subespécies *indica* e *japonica*, sendo que o segundo valor de ΔK apresentou um pico menor k = 5, o que, por sua vez, permitiu reconhecer os grupos *indica*, *japonica* (tropical), *japonica* (temperado) e grupos desconhecidos (Figura 2).

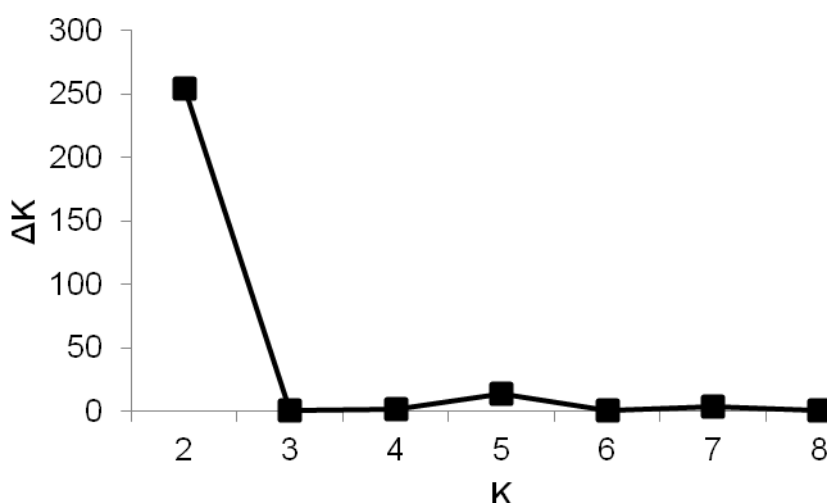


Figura 2. Média dos valores de ΔK de Evanno et al. (2005) para duas repetições de simulações no programa Structure com k = 1 a 10 para 151 genótipos de arroz. Embrapa/CGF/ UFPel, 2015.

Utilizando 203 genótipos de arroz e analisando a estrutura populacional, Bosetti (2012) evidenciou picos para K = 2 e K = 8. Isso sugere na existência inicial de grupos de similaridade, coincidindo com os resultados obtidos neste estudo.

A identificação dos genótipos pertencentes à subespécie *indica* ou *japonica* em estudos de variabilidade genética utilizando marcadores SSR, vem sendo bastante relatada em estudos de acesso de germoplasma (GARRIS et al., 2005; THOMSON et al., 2007, 2009; ZHANG et al., 2009).

Pode ser observado que a sumarização das 20 réplicas para $K=2$ apresentou uma similaridade de 99%, indicando que a atribuição dos genótipos para cada sub acesso foi bem correlacionada entre as corridas.

Um acesso foi considerado como pertencente a uma determinada população quando seu coeficiente de adesão foi $\geq$ a 80%.

O menor valor de k permitiu o agrupamento de padrões em seus respectivos grupos, foi $k = 2$ (Figura 2). Para $k = 5$, que apresentou o segundo maior valor para ΔK , os padrões foram separados de acordo com o seu grupo anteriormente conhecido (Figura 3).

Para o valor de $K = 2$ (Figura 3a), 74 acessos pertenceram exclusivamente a um grupo da subespécie *indica*, sendo que dez genótipos pertencentes ao grupo *japonica* temperado apresentaram uma pequena probabilidade de agrupamento com estes padrões (Agulhinha Branco, Amarelinho, Arroz Amarelo e Branco, Arroz de seco, Arroz Da Terra, Cateto Coleta, BRs 358 (CNAI 9903), Itaqui-A e Rio Grande), assim como um genótipo pertencente ao grupo *japonica* tropical (IAC 500), podendo sugerir que, provavelmente, ocorreu uma introgressão de alelos ou a probabilidade de possuírem um progenitor em comum entre eles.

Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos realizados por Choudhury et al. (2013), onde genótipos de arroz *indica* e *japonica* foram agrupados e esta estruturação poderia ser devido a intercâmbios parciais do polimorfismo genético dos progenitores (GAO; INNAN, 2008).

Enquanto que 58 foram agrupados no grupo *japonica* tropical e temperado e os restantes nos grupos desconhecidos. Um total de 19 (12,58%) genótipos apresentaram probabilidade de pertencer aos dois grupos, considerados como não estruturados “mistos”, pois compartilhavam alelos de ambos os grupos.

Estes resultados coincidem com os obtidos em outros estudos em que a separação é clara quando dois grupos são considerados nas análises (THOMSON et al., 2009; ZHANG et al., 2009). A proximidade genética entre genótipos oriundos de um mesmo país ou região geográfica foi observada em outros estudos (ALI et al., 2011; GARRIS et al., 2005), podendo ser uns dos motivos do agrupamento desses genótipos.

Posteriormente, para $k = 5$ (Figura 3b), as variedades *indica* formaram um agrupamento com a presença de quatro genótipos do grupo *japonica* temperado (Agulhinha Branco, Arroz Amarelo e Branco, Arroz Da Terra e BRs 358 (CNAI 9903), sendo que 61 dos 151 genótipos foram agrupados em diversos subgrupos que englobaram, também, introduções dos Estados Unidos, Japão, Vietnã, Filipinas, Uruguai, Colômbia e Brasil, os grupos *indicas*, *japonica* tropical e temperado.

a)



b)

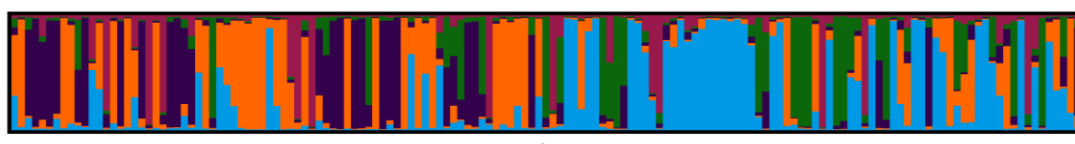


Figura 3. . Alocação de 151 genótipos de arroz em grupos identificados na análise da estrutura do germoplasma usando o programa Structure para: a) $k=2$, acessos identificados com azul= *indica*, em laranja= *japonica*. b) $k=5$, cada cor representa uma diferente subgrupo azul= *indica*, em laranja= mistura de *indica* e *japonica* temperado, em roxo=*japonica* tropical em verde=*japonica* temperado, e lilás=som classificados. Embrapa/CGF/ UFPel, 2015.

Foi possível observar que 29 genótipos foram agrupados no grupo *japonica*, com introgressão de genótipos do grupo *indica* (Basmati 370 e Cristal). O maior grupo identificado foi composto exclusivamente por 60 acessos, sendo que estes acessos apresentaram uma probabilidade de pertencerem aos quatro grupos.

Em trabalhos realizados por Thomson et al. (2007) com variedades da Indonésia, foi possível observar que as variedades se agruparam dentro do grande grupo *japonica*, tornando difícil estabelecer uma fronteira entre os grupos temperado e tropical, dados que coincidem com os obtidos por Bosetti (2012) quando analisados acessos de *japonica* tropical e temperado.

É provável que essa proximidade observada entre os genótipos possa ter implicado no padrão de agrupamento, onde primeiramente os genótipos foram identificados como mais próximos, formando esse grande grupo, e consequentemente os outros genótipos.

Marcadores moleculares microssatélites fornecem informações complementares para o entendimento de questões botânicas a nível intraespecífico, bem como a relações do germoplasma com o ambiente de coleta (SANTOS-GARCIA et al., 2012).

Entretanto, a falta de informações dos genótipos quanto ao seu ambiente original dificulta o entendimento da relação entre os grupos identificados. Um elemento que ocasiona confusão em quanto o estudo de coleções de germoplasma é que os genótipos ou variedades são frequentemente estudados de forma isolada e desconectada do seu ambiente original (THOMSON et al., 2009), sendo que a disponibilidade de informações poderia permitir a investigação de maneira mais aprofundada das relações entre as variedades e o seu contexto original.

4.3.4 Distribuição da variabilidade genética

Pela análise de variância molecular (AMOVA), permitiu-se identificar que 13,60% das variações foram entre grupos e a maior variabilidade genética (86,40%) foi originária de variações dentro dos grupos, indicando que a grande maioria da variabilidade genética encontra-se dentro dos grupos, podendo dizer que a variância genética encontra-se distribuída heterogeneamente, de forma que a maior parte da variabilidade encontra-se dentro de cada grupo (Tabela 3).

Tabela 3. Análise molecular da variância (AMOVA) baseada em nove *loci* SSR para 151 genótipos de *Oryza sativa* L. avaliados quanto à estrutura genética. Embrapa/CGF/ UFPel, 2015.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Porcentagem (%)
Entre grupos	2	80,83	0,81	13,60**
Dentro dos grupos	148	772,58	5,22	86,40**
Total	150	853,51	6,04	100

** Significativo ao nível de 1% probabilidade de erro.

Utilizando a análise de variação molecular em 59 genótipos de arroz Hassan et al., (2012) verificou uma variação entre os acessos de 91%, seguido de 9% dentro do grupo, concluindo que a variação entre as variedades locais foi maior que dentro das variedades entre os genótipos estudados.

Outros estudos em arroz utilizando a análise de AMOVA, também apresentaram uma alta variabilidade entre os grupos, como é o caso de trabalhos realizados na região de Himalaia, onde os resultados indicam que 66% da variação total é devido à diferenciação das variedades de arroz, indicando, desta forma, uma grande variabilidade genética nessa região (CHOUDHURY, 2013).

Do mesmo modo, Cao et al., (2006) confirmou diferenças de 35,14% na variação genética total quando foi realizado um estudo por região, e 18,65% entre as população e 46,21% dentro das população. Sendo assim, recomenda-se aumentar a utilização dos recursos genéticos de arroz, com o intuito de se obter uma maior vantagem sobre a da variabilidade genética do gênero *Oryza*.

4.4 CONCLUSÕES

Dos 151 genótipos estudados pertencentes ao Banco de germoplasma da Embrapa utilizando nove *locus* SSR, foi concluído que:

Os genótipos do banco ativo de germoplasma da Embrapa possuem grande variabilidade genética.

O germoplasma avaliado é geneticamente estruturado em dois subgrupos: *indica* e *japonica*

Cultivares de arroz desenvolvidas para região sul do Brasil apresentam base genética estreita. Sendo que a atual situação caracteriza uma vulnerabilidade genética, que favorece nenhum ou pouco ganho genético para seleção.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, F.; ONODERA, H.; TOKI, S.; TANAKA, H.; KOMATSU, S. *OsCDPK13*, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. **Plant Molecular Biology**. v. 55, p.541–552. 2004.
- ACEVEDO, M.; TORRES, E.; MORENO, O.; ÁLVAREZ, R.; TORRES, O.; CASTRILLO, W.; TORREALBA, G.; REYES, E.; SALAZAR, M.; NAVAS, M. Base genética de los cultivares de arroz de riego liberados en Venezuela. **Agronomía Tropical**. v.57, p.197-204, 2007.
- AGHAEE, A.; MORADI, F.; MAIVAN, H.Z.; ZARINKAMAR, F.; IRANDOOST, P.; SHARIFI, P. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to chilling stress at seedling stage. **Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 39, p. 7617-7621, 2011.
- AGUIRRE, C.; ALVARADO, R.; HINRICHSSEN, P. Identificación de Cultivares y Líneas de Mejoramiento de Arroz de Chile Mediante Amplificación de Fragmentos Polimórficos (AFLP). **Agricultura Técnica**, v. 65, n.4, p.356-369, 2005.
- ALCOCHETE A. A. N. de. Diversidade genética e mapeamento de QTLs do sistema gênico de macho-esterilidade termosensível (TGMS) do genoma de arroz (*Oryza sativa* L.). **Dissertação** Universidade de Brasília. 293 p. 2005.
- ALI, M.L.; MCCLUNG, A.M.; JIA, M.H.; KIMBALL, J.A.; MCCOUCH, S.R.; EIZENGA, G.C. A rice diversity panel evaluated for genetic and agromorphological diversity between subpopulations and its geographic distribution. **Crop Science**, v. 51, p. 2021-2035, 2011.
- ALONÇO, A. DOS S.; SANTOS, A.B. DOS; GOMES, A.DA S.; GRUTZMACHER, A.D.; ANDRES, A.; PRABHU, A.S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.M.; TERRES, A.; FERREIRA, C.M.; NUNES, C.D.; FRANCO, D.F.; PAULETTO, E.A.; MARCHEZAN, E.; FERREIRA, E.; VERNETTI JR, F. DE J.; BRAGA, H.J; AZAMBUJA, E.H.V.; HECKLER, J.C. Fatores climáticos que afetam o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade do arroz irrigado. **Embrapa Clima temperado, Sistema de Produção**, (EMBRAPA. Documentos, 3, versão eletrônico), 2005.
- AMARAL, A. dos S.; SANTOS, E.C. dos. Efeito da umidade e da temperatura do solo na emergência de plântulas de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**. v.5, n.1, p.43-54, 1983.
- ANDAYA, V.C.; MACKILL, D. J. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 2579-2585, 2003.

ANDAYA, V.C.; TAI, T.H. Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**. v.113, p.467–475. 2006.

ARAI-KICHISE, Y.; SHIWA, Y.; KAWORU, E.; HATTA, M.S.; YOSHIKAWA, H.; YANO, M.; WAKASA, K. Genome-wide DNA polymorphisms in seven rice cultivars of temperate and tropical japonica groups. **Plosone**. v. 9, n. 1, 2014.

ARAUJO, E.S.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Características morfológicas e molecular e acúmulo de proteína em grão de variedades de arroz do Maranhão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 38, v. 11, p. 1281-1288, 2003.

ARNAO, E.; PERDOMO, R.; GRATEROL, E. Diversidad genética en cultivares de soya utilizando marcadores Microsatélites, en Venezuela. **Revistas Científicas de América Latina**. v. 35, n. 7, 2010.

ARNOA, E. RODRÍGUEZ, N.; HINRINSEN, P.; JAYARO, Y.; RAMIS, C.; ALMEIDA, I.P. Evolución de la diversidad genética de subespecies de arroz usando marcadores microsatelitales y AFLP. **Agronomía Tropical**. n.57, p.45-50, 2007.

ARRIEL, N. H. C. Diversidade genética em gergelim (*Sesamum indicum* L.) a partir de marcadores moleculares (RAPD) e caracteres morfológicos e agrônômicos. 2004, 114p. **Tese**— Universidade Estadual Paulista, 2004.

ATKINSON, N. J.; AND URWIN, P.E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, n.63, p.3523–3544, 2012.

BARUAH A R, ISHIGO-OKA N, ADACHI M, OGUMA Y, TOKIZONO Y, ONISHI K, SANO Y. Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. **Euphytica**, v.165, p. 459–470. 2009.

BENITEZ, L. C.; SILVA RODRIGUES, I.C. DA; ARGE, L. W.P.; RIBEIRO, M. V.; BRAGA, E. J. B. Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse salino durante a fase vegetativa. **Revista Ciência Agronômica**. v. 42, n.2, p.409-416, 2011.

BERTIN, P., KINET, J.M., BOUHARMONT, J. Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. **Euphytica**, v.89, p.201-210, 1996.

BERTINI, C. H. C. DE M.; ALMEIDA, W. S. DE; SILVA, A.P. M. DA; SILVA, J.W. L. E; TEÓFILO, E. M. Análise multivariada e índice de seleção na identificação de genótipos superiores de feijão-caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.32, n.4, p. 613-619, 2010.

BEVILACQUA, C. B.; MONZON, D. R.; VENSKE, E.; BASU, S.; ZIMMER, P. D. Application of Stress indices for low temperature and deep sowing stress

screening of rice genotypes. **Pakistan journal of biological Sciences**, v.16, n.22, p.18-22, 2013.

BIOVERSITY INTERNATIONAL; IRRI; WARDA. **Descriptors for wild and cultivated rice (*Oryza spp.*)**. 72 p., 2007.

BORBA, T.C.O. Análise por marcadores SSR dos grupos de genótipos melhorados e introduzidos da Coleção Nuclear Brasileira do arroz. **Dissertação**. Universidade Federal de Goiás, 90p., 2005.

BORBA, T.C.O.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, C. Microsatellite marker-mediated analysis of the EMBRAPA rice core collection genetic diversity. **Genetica**, v. 137, p. 293–304, 2009.

BORBA, T.C.O.; MENDES, C.A.; GUIMARÃES, E.P.; BRUNES, T.O.; FONSECA, J.R.; BRONDANI, R.V.; BRONDANI, C. Genetic variability of Brazilian rice landraces determined by SSR markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 706-712, 2009

BOSETTI, F. Diversidade genética em germoplasma de arroz japonês utilizando marcadores moleculares e agromorfológicos. **Tese** (Doutorado) Genética e Melhoramento de Plantas. Piracicaba. 2012.

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

BOUHADIDA, M.; MORENO, M.A.; GONZALO, M.J.; ALONSO, J.M.; GOGORCENA, Y. Genetic variability of introduced and local Spanish peach cultivars determined by SSR markers. **Tree Genetics e Genomes**, v. 7, p. 257-270, 2011.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**. v.218, p.443–448. 1982.

BRASIL. Decreto nº 2.366, de 5 de novembro de 1997. Regulamenta a lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997, que institui a Proteção de Cultivares, dispõe sobre o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, n. 216, p. 25333–25354, 7 nov. 1997. Seção 1, Edição comum.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 2009.

BRESEGHELLO, F.; CASTRO, E.M. DE; MORAIS, O.P. DE. Progressos genéticos pelo melhoramento do arroz de terras altas da Embrapa para os estados de Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Piauí e Mato Grosso. Goiânia: **EMBRAPA, CNPAF**, (EMBRAPA, CNPAF.Documentos, 20), p.24, 2006.

BRESEGHELLO, F.; RANGEL P. H. N.; MORAIS O. P. DE. Ganho de produtividade pelo melhoramento genético do arroz irrigado no nordeste do Brasil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.34, n.3, p.399-407, 1999.

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; BORBA, T.C.O.; MENDONÇA, J.A.; MOURA NETO, F.R.; FRANCO, D.F.; UTUMI, M.M.; PEREIRA, J.A.; CORDEIRO, A.C.C.; FONSECA, J.R. **Coleção nuclear de arroz da Embrapa caracterização agrônômica**. Goiânia: EMBRAPA, CNPAF, 2006. 28 p. (EMBRAPA. CNPAF. Documentos, 169).

BRUNES, T. O.; RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, R.P.V.; NETO, F.M.; NEVES, P. DE C.F.; BRONDANI, C. Fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado estimado por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v.37, n. 2, p.86-92. 2007.

CAICEDO, A.L.; WILLIAMSON, S.H.; HERNANDEZ, R.D.; BOYKO, A.; FLEDELALON, A.; YORK, T.L.; POLATO, N.R.; OLSEN, K.M.; NIELSEN, R.; MCCOUCH, S.R.; BUSTAMANTE, C.D.; PURUGGANAN, M.D. Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 9, p. 1745-1756, 2007.

CAO, Q.; LU, B. R.; XIA, H.; RONG, J.; SALA, F.; SPADA, A.; GRASSI, F. Genetic diversity and origino f weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) populations found in North-eastern China revealed by simple sequence repeat (SSR) markers. **Annals of Botany**. v. 98, p. 1241-1252, 2006.

CARGNIN A.; SOUZA, M. A. DE; PIMENTEL, A. J. B.; FOGAÇA, C. M. diversidade genética em cultura de arroz e correlação entre caracteres agrônômicos. **Revista Ceres**. v.1, n.57, p.53-59, 2010.

CASTILLO, D.; ALVARADO, R. Caracterización de germoplasma de arroz para tolerancia a frío en la etapa de germinación. **Agricultura Técnica**, v. 62, n. 4, p. 596-605, 2002.

CHENG, C.Y.; MOTOHASHI, R.; TSUCHIMOTO, S.; FUKUTA, Y.; OHTSUBO, H.; OHTSUBO, E. Polyphyletic origin of cultivated rice: based on the interspersed pattern of SINES. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 67–75, 2003.

CHIES, T. T. de S.; LONGHI-WAGNER, H. M. Polimorfismo morfológico. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Orgs) **Genética e evolução vegetal**. p. 291-309, 2003.

CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J. K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 225-236, 2004.

CHOUDHURY, B.; KHAN, M. L.; DAYANANDAN, S. Genetic structure and diversity of indigenous rice (*Oryza sativa*) varieties in the Eastern Himalayan region of Northeast India. **Springer Plus**. v. 2, n. 228. 2013.

CONAB. Campanha Nacional de abastecimento. Safra 2014/15, v. 2, n. 6, p. 48-54. 2014. Disponível: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1306&ordem=criterioSafra1> Acessado 11 Março 2015.

CORREDOR, E; CRUZ, M; BERRÍO L. Fitomejoramiento. Actividades sobresalientes 2006-2007; **Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego (FLAR)**, 82 p. 2007.

CRISPIN, B. C. F. Variabilidade genética no gênero *Oryza*. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, 2012.

CRUZ, C. D. Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística. **Viçosa: UFV**, 648 p. 2001.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, p.442. 2006.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 585 p. 2003.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. v. 1, 3. ed. **Viçosa: Editora UFV**, p. 480, 2004.

CRUZ, R. P. DA; MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C.; LIMA, J. C. DE; SILVA SERAFIM, D. C. DA. Variabilidade fenotípica e molecular em genótipos de arroz com diferentes reações ao frio. **Revista Brasileira Agrociência**, v.13, n.4, p.424-431, 2007.

CRUZ, R.; MILACH, S.C.K. Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2004.

CRUZ, R.; MILACH, S.C.K. Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 909-917, 2000.

CRUZ, R.P Tolerância ao frio em arroz irrigado: Metodologias de avaliação e bases genéticas. **Tese**. Porto Alegre, 174p. 2001.

CRUZ, R.P. DA; MILACH, S.C.K. Cold tolerance at the germination stage of rice: Methods of evaluation and characterization of genotypes. **Scientia Agrícola**, v.61, n.1, p.1-8, 2004

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Inheritance of rice cold tolerance at the germination stage. **Genetics and Molecular Biology**. v. 29, n. 2, p. 314-320, 2006.

CUEVAS-PEREZ FE, GUIMARÃES EP, BERRIO LE AND GOZÁLEZ DI
Genetic base of irrigated Rice in Latin America and the Caribbean 1971 to 1989. **Crop Science** v.32, p.1054-1059, 1992.

DA LUZ , V. K.; Identificação de famílias mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) para características de importância agrônômica e tolerância a baixas temperaturas na germinação. **Tese**.88p. 2011.

DILDAY, R.H. Contribution of ancestral lines in the development of new cultivars of rice. **Crop Science**, n.30, p.905-911, 1990.

DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. T. Bancos genéticos de plantas, animais e microrganismos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 13, p. 34-38, 2000.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

EARL, D.A.; von HOLDT, B.M. **Structure harvester**. Disponível em: <<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>>. Acesso em: 20 dic. 2014.

EBANA, K.; KOJIMA, Y.; FUKUOKA, S.; NAGAMINE, T.; KAWASE, M. Development of mini core collection of Japanese rice landrace. **Breeding Science**, v. 58, p. 281-291, 2008.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

FAGUNDES, P.R.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; STEINMETZ, S. Tolerância de genótipos de arroz irrigado ao frio nos estádios de germinação e emergência. In: Embrapa Clima Temperado, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 118. P. 19. 2010.

FALEIRO, F.G. Marcadores Genético- Molecular aplicado a programas de conservação e uso de recursos genéticos. **EMBRAPA- PLANALTINA**, p. 99, 2007.

FALEIRO, F.G.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; MELO, G.R.P.; MONTEIRO, W.R.; PIRES, J.L.; ROCHA, J.B.; BAHIA, R.C.S.; GOMES, L.M.C.; ARAÚJO, I.S.; FALEIRO, A.S.G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.12-17, 2004.

FAN, S. Global population versus food production. **Rice Today**, Los Baños, v. 10, n. 4, p. 50, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: **Embrapa-Cenargen**, (Embrapa Cenargen. Documentos, 20) ed. 3, 220p. 1998.

FREI, M.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Studies on in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v.83, p.395-402. 2003.

FREITAS, D.A.C.; PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; ZIMMER, P.D.; FAGUNDES, P.R.R.; AMARAL, F.P.; RECH, E.G.; MENEGHELLO, G.E. Identification of genes involved in rice seed germination at low temperature. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, v.3, n.5, p. 83-88, 2011.

FUJINO K, SEKIGUCHI H, SATO T, KIUCHI H, NONOUE Y, TAKEUCHI Y, ANDO T, LIN SY, YANO M. Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical Applied Genetics**, v.108, n.5, p.794-799. 2004.

FUJINO, K.; SEKIGUCHI, H.; SATO, T.; KIUCHI, H.; NONOUE, Y.; TAKEUCHI, Y., ANDO, T.; LIN, S.Y.; YANO, M. Mapping quantitative trait loci controlling lowtemperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 794-799, 2004.

GAO, L.; INNAN, H. Non-independent domestication of the two rice subspecies, *Oryza sativa* subsp. *indica* and subsp. *japonica*, demonstrated by multilocus microsatellites. **Genetics**, v.179, p. 965–976, 2008.

GARRIS, A. J., T. H. TAI, J. COBURN, S. KRESOVICH AND S. MCCOUCH Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics Society of America**. n.169, p.1631-1638, 2005.

GARRIS, A.J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v. 169, n. 3, p. 1631-1638, 2005.

GHOSH, D.; XU, J. Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. **Frontiers in plant science**, v.5, n.6, p. 1-13, 2014.

GOULART, I.C.G.R.; KUPAS, V.; DIAS, L.P.; ROSA, T.M.; BORBA, T.C.O.; MENEZES, V.G. MEROTTO, J.A. Análise da estrutura populacional e determinação do fluxo gênico entre populações de arroz vermelho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO. p.427-430. 2011.

GOWDA, V. R. P., HENRY, A., YAMAUCHI, A., SHASHIDHAR, H. E., AND SERRAJ, R. Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. **Field Crops Res**. n.122, p.1–13, 2011.

GUNAWARDENA, T. A.; FARRELL, T. C.; FUKAI, S.; BLAMEY, F.P.C.; WILLIAMS, R.L. Research on cold tolerance in Australia: focusing on nitrogen-cold interactions and genotypic variation. In: HILL, J. E.; HARDY, B. (Eds.)

Proceedings of the Second Temperate Rice Conference, p. 195-200. 13-14 June 1999. Los Banos: International Rice Research Institute, 2002.

HARRISON, R.E.; LUBY, J.J.; FUNIER, G.R.; HANCOCK, J.F. Differences in the apportionment of molecular and morphological variation in North American strawberry and consequences for genetic resources management. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.47, p.647-657, 2000.

HASSAN, M. M.; SHAMSUDDIN, A. K. M.; ISLAM, M. M.; KHATUN, K.; HALDER, J. Analysis of genetic diversity and population structure of some Bangladeshi rice landrace and HYV. **Journal of Scientific Research**. v. 4, n. 3, p. 757-767. 2012.

HAZEN, S. P.; WU, Y.; KREPS, J. A. Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. *Functional & Integrative Genomics*, v.3, p.105-111, 2003.

HOOGERHEIDE, E.S.S. Divergência genética entre acessos de alho avaliados em ambientes distintos baseada em variáveis quantitativas e qualitativas. **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 118 p., 2009.

HOPKINS, A. A.; VOGEL, K. P.; MOORE, K.J.; JOHNSON, K. D.; CARLSON, I.T. Genotypic variability and genotype × environment interactions among switchgrass accessions from the Midwestern USA. **Crop Science**, v. 35, p. 565-571, 1995.

HOSSAIN, M. Rice facts: a balancing act. **Rice today**, v. 6, p. 37, 2007.

HUANG X, KURATA N, WEI X, WANG ZX, WANG A, ZHAO,Q.; ZHAO,Y.; LIU, K.; LU. H.; LI, W.; GUO, Y.; LU, Y.; ZHOU, C.; FAN, D.; WENG, D.; ZHU, C.; HUANG, T.; ZHANG, L.; WANG, Y.; FENG, L.; FURUUMI, H.; KUBO, T.; MIYABAYASHI, T.; YUAN, X.; XU, Q.; DONG G.; ZHAN, Q.; LI, C.; FUJIYAMA, A.; TOYODA, A.; TINGTING, L.; FENG, Q.; QIAN, Q.; LI, J.; HAN, B. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. **Nature**, v.490, p. 497-501, 2012.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (IRRI). **World rice statistics**. Disponível em: <<http://irri.org/our-science/targetingand-policy/world-rice-statistics>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

IRGA. Instituto Rio-grandense do sul. Disponível: http://www.irga.rs.gov.br/upload/20140224154739cultivares_regionais_2013_14.pdf . Acessado: 20 janeiro, 2015.

IRGA. Instituto Rio-grandense do sul. Disponível: http://www.irga.rs.gov.br/upload/20140224154739cultivares_regionais_2013_14.pdf . Acessado: 20 janeiro, 2015

IRRI. Catalog of descriptors for rice (*Oryza sativa* L.). Manila: IRRI: IBPGR, 1980. 21 p.

IRRI. [Rice science for a better world](http://irri.org/). Disponível: <http://irri.org/>. Acessado 15 janeiro 2015.

JENA K.K.; MACKILL D.J. Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. **Crop Science**. n.48, p.1266-1276. 2008.

JI, Z.; ZENG, Y.; ZENG, D.; MA, L.; LI, X.; LIU, B.; YANG, C. QTL for rice cold tolerance identified at plumule and 3-leaf-seedling stage using QTLnetwork software. **Rice Science**. n. 17, v.4, p.282-287, 2010.

JIANG, L.; XUN, M. M.; WANG, J. K.; WAN, J.M. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines. **J Cereal Sci**, 48: 173-179. 2008.

JIN, L.; LU, Y.; XIAO, P.; BAO, J. Genetic diversity and population structure of a diverse set of rice germplasm for association mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.121, p.475-487, 2010.

JONES, D.B.; PETERSON, M.L. Rice seedling vigor at sub-optimal temperatures. **Crop Science**, v. 16, p. 102-105, 1976.

KANAWAPEE, N.; SANITCHON, J.; SRIHABAN, P.; THEERAKULPISUT, P. Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers. **Electron Journal of Biotechnology**. v.14, p.1-17, 2011.

KANEDA, C.; BEACHELL, H.M. Response of *indica-japonica* rice hybrids to low temperatures. **SABRAO J**. v.6, p.17–32. 1974.

KHAN, D.R.; MACKILL, D.J.; VERGARA, B.S. Selection for tolerance to low temperature-induced spikelet sterility at anthesis in rice. **Crop Science**, v.26, n.4, p.694-698, 1986.

KHUSH G.S What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular**. v.59, p.1-6. 2005.

KHUSH, G.S. Green revolution: preparing for the 21st century. **Genome**. v.42, p.646–655. 1999.

KHUSH, G.S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**, v. 59, p. 1-6, 2005.

KIM, S.I.; TAI, T.H. Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: a comparison of visual ratings and quantitative indicators of physiological changes. **Euphytica**. v. 178, n.3, p.437-447. 2011.

KONISHI, S.; IZAWA, T.; LIN, S.Y.; EBANA, K.; FUKUTA, Y.; SASAKI, T.; YANO, M. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. **Science**, v. 312, p. 1382–1396, 2006.

LI, C.; ZHOU, A.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, v. 311, p. 1936–1939, 2006.

LI, T.G., VISPERAS, R.M., VERGARA, B.S. Correlation of cold tolerance at different growth stages in rice. **Acta Botanica Sinica**, v.23, p.203-207, 1981.

LI, X.; YAN, W.; AGRAMA, H.; HU, B.; JIA, L.; JIA, M.; JACKSON, A.; MOLDENHAUER, K.; McCLUNG, A.; WU, D. Genotypic and phenotypic characterization of genetic differentiation and diversity in the USDA rice mini-core collection. **Genetica**, v. 138, p. 1221-1230, 2010.

LI, X.; YAN, W.; AGRAMA, H.; HU, B.; JIA, L.; JIA, M.; JACKSON, A.; MOLDENHAUER, K.; McCLUNG, A.; WU, D. Genotypic and phenotypic characterization of genetic differentiation and diversity in the USDA rice mini-core collection. **Genetica**, v. 138, p. 1221-1230, 2010.

LI, Y. C.; ROROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**. v.11, p.2453-2465, 2002.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**,v.21, n.6, p.991-1007,2004.

LIU, K.; MUSE, S.V. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, v. 21, p. 2128–2129, 2005.

LONDO, J.; SCHAAAL, B. Origins and population genetics of weedy red rice in the USA. **Molecular Ecology**, v. 16, p.4535- 4523. 2007

LONDO, J.P.; CHIANG, Y.C.; HUNG, K.H.; CHIANG, T.Y.; SCHAAAL, B.A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 103, p. 9578-9583, 2006.

LOU, J.; TANG, S.; HU, P.; LOUIS, A.; JIAO,G.; TANG, J. Analysis on factors affecting seedling establishment in rice. **Rice Science**. v. 14, n.1, p. 27-32. 2007.

LOU, Q. J.; CHEN, L.; SUN, Z. X.; XING, Y. Z.; LI, J.; XU, X. Y.; MEI, H. W.; LUO, L. J. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, n.158, p. 87-94. 2007.

LOU, Q.J.; CHEN, L.; SUN, Z.X.; XING, Y.Z.; LI, J.; XU, X.Y.; MEI, H.W.; LUO, L.J.A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, v. 158, p. 87-94. 2007.

LYONS, J.M. Chilling injury in plants. **Annual Review of Plant Hysiology**. v.24, p.445- 466. Palo Alto CA, 1973.

MACKILL, D.J.; LEI, X. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. **Crop Science**, v. 37, p. 1340-1346, 1997.

MAGALHÃES JÚNIOR, A.M DE, Recursos genéticos de arroz (*Oryza sativa* L.) no Sul do Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Pelotas, 160p. 2007.

MARINI, N. Qualidade de grãos, tolerância ao estresse por ferro e variabilidade genética em arroz. **Teses**. Universidade Federal de Pelotas. 126p. 2012.

McCOUCH S.R., L. TEYTELMAN, Y. XU, K.B. LOBOS, K. CLARE, M. WALTON, B. FU, R. MAGHIRANG, Z. LI, Y. XING, Q. ZHANG, I. KONO, M. YANO, R. FJELLSTROM, G. DECLERK, D. SCHNEIDER, S. CARTINHO, D. WARE & L. STEIN. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research**, n.9, p.199-207, 2002.

McCOUCH, S.R. Diversifying selection in plant breeding. **Plos Biology**. v.2, p.1507-1512, 2005.

MELO, L.F. Divergência genética em subamostras de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) por meio de marcadores agromorfológicos e microssatélites. **Dissertação**. Universidade Federal do Piauí. 106 p. 2011.

MENDES, G.C. Caracterização fisiológica de plantas superexpressando GmNAC6 em soja e seus efeitos na morte celular programada. **Tese** Universidade Federal de Viçosa. 115p. 2013.

MENEZES, B.R. DA S.; MOREIRA, L.B.; PEREIRA, M.B.; LOPES, H.M.; COSTA, E.M.; CURTI, A.T.M. Caraterísticas morfoagronômicas de dois genótipos arroz vermelho em cultivo inundado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.7, n.3, p. 39-401, 2012.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; SOARES, R. C.; BALDIGA, R. F.; PESKE, F. B.; MORAES, D. M. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**. v.31, n.2, p.254-262, 2009.

MERTZ, L. M.; HENNING, F.A.; SOARES, R.C.; BALDIGA, R.F.; PESKE, F.B.; MORAES, D. M. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.254-262, 2009.

MILACH, S.C.K. Mapeamento molecular de características de importância agronômica. **Marcadores moleculares em plantas**. S.C.K. Milach, p.67-73. 1998.

MIURA, K.; LIN, S.Y.; YANO, M.; NAGAMINE, T. Mapping quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Breeding Science**, v. 51, p. 293-299, 2001.

MOHAPATRA, S.S.; WOLFRAIM, L.; POOLE, R. J.; DHINDSA, R.S. Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold- acclimation- specific genes of alfalfa. **Plant Physiology**, v.89, p.375-380, 1989.

MONTALVÁN, R.; DESTRO, D.; SILVA, E. F.; MONTAÑO, J.C. Genetic base of Brazilian upland rice cultivars. **Journal of Genetics & Breeding**, v. 52, p. 203-209, 1998.

MOREIRA, J. de A. N.; SANTOS, J. W. dos; OLIVEIRA, S. R. de M. Abordagens e metodologias para avaliação de germoplasma. **Embrapa-Brasília SPI**, p.115, 1994.

MOYNIHAN, M.R.; ORDENTLICH, A.; RASKIN, L. Chilling-Induced heat evolution in plants. **Plant Physiology**. v.108, p.995-999, 1995.

MÜHLEN, G.S.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores moleculares de DNA. **Scientia Agricola**. v.57, p.319-328, 2000.

MULATO, B. M. Diversidade genética em germoplasma de soja identificada por marcadores SSR, EST-SSR e caracteres agromorfológicos. **Dissertação**. Universidade de São Paulo. 87 p., 2009.

NAGAMINE T. Genic control of tolerance to chilling injury at seedling stage in rice. **Japanese Journal of Breeding**, v.41, p.35-40. 1991.

ÑANCULAO, G.D.; CÁRCAMO, M.P.; SANTOS, O.A.DE LOS; VELÁSQUEZ, V.B. Cold tolerance evaluation in Chilean rice genotypes at the germination stage. **Chilean Journal Of Agricultural Research**. v.73, n.1, p. 03-08. 2013.

NANDA, J. S.; SESHU, D. V. Breeding strategy for cold-tolerant rice. Los Baños: **International Rice Research Institute**. p. 91-99, 1979.

NASCIMENTO, W.F. DO. Caracterização morfoagronômica de acessos de arroz (*Oryza sativa* L.) de terras altas. **Dissertação** Universidade Federal de Pernambuco. 2008.

NI, J.; COLOWIT, P.M.; MACKILL, D.J. Evaluation of genetic diversity in Rice subspecies using microsatellite markers. **Crop Science**, v.42, p. 601-607, 2002.

NISHIYAMA, I. Morphological damages caused by the cool weather. In Matsuo, T.; Hoshikawa, K. Eds.; **Science of the rice plant**, v. 1, p.580-587, 1993.

OKUMOTO, Y. Seedling. In: MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F. & YAMAGUCHI, H. (Eds.). **Science of the Rice Plant: Genetics**. 3.ed. p.256-262. 1997.

PACHECOY, M. I. Tolerancia ao frio em estádios tempranos del desarrollo em arroz: caracterización fenotípica de germoplasma de origen diverso y variación alélica em genes candidatos. **Dissertação**. Universidad Nacional de Mar de Plata. 73p., 2011.

PORCH, T. G. Application of Stress Indices for heat tolerance Screening of common bean. **Journal of Agronomy and Crop Science**. v.192, n.5, p.390-394, 2006

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

QIAN, Q.; ZENG, D.L.; HE, P. QTL analysis of the rice seedling cold tolerance in a double haploid population derived from another culture of a hybrid between *indica* and *japonica* rice. **Chinese Science Bulletin**. v.145, n.5, p.448–453. 2000.

RAIMONDI, J.V.; MARSCHALEK, R.; NODARI, O. Genetic base of paddy rice cultivars of southern Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 14, p.194-199, 2014.

RAJEMDRAN, N.; MUKHERJEE, L.; REDDY, K.K.; SHASHIDHAR, H.E. DNA fingerprinting and estimation of genetic diversity among hybrid rice parental lines (*Oryza sativa* L.) using simple sequence repeats (SSR) markers. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**. v.4, n.11, p.169-174, 2012.

RANGEL PHN, GUIMARÃES EP AND NEVES PCF Base genética das cultivares de arroz *Oryza sativa* L. irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.31, p.349-347. 1996.

REDDY, A. R.; RAMAKRISHNA, W.; SEKHAR, A. C.; ITHA L, N.; BABU, P. R.; BONALDO, M. F.; SOARES, M. B.; BENNETZEN, J. L. Novel genes are enriched in normalized cDNA libraries from drought-stressed seedlings of rice (*Oryza sativa* L. subsp. Indica cv. Nagina 22). **Genome**. v. 45, p. 204–211. 2002.

RENAWAKE, A.L.; MANANGKIL, O.E.; YOSHIDA, S.; ISHII, T.; MORI, N.; NAKAMURA, C. Mapping QTLs for cold tolerance at germination and the early seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. v.28, n. 6, p. 989-998, 2014.

RODRIGUES, H. C. S.; BEVILACQUA, C. B.; BAHRY, C. A.; MONZON, D. L. R.; VIANA, T. P.; ZIMMER, P. D.; FAGUNDES, P. R. R. Aplicação de índice de estresse para a tolerância ao frio no desenvolvimento inicial de cultivares de arroz. **Científica**, v.42, n.3, p. 258-264, 2014.

RODRIGUEZ, M.; RAU, D.; PAPA, R.; ATTENE, G. Genotype by environment interactions in barley (*Hordeum vulgare* L.): different responses of landraces,

recombinant inbred lines and varieties to Mediterranean environment. **Euphytica**: v. 163, p. 231-247, 2008.

SANGHERA, G.S.; WANI, S.H.; HUSSAIN, W.; SINGH, N.B. Engineering cold stress tolerance in crop plants. **Current Genomics**, v.12, n.1, p.30-43, 2011.

SANTOS, A.B.; STONE, L.S.; VIEIRA, N.R.A.; A cultura do arroz no Brasil, 2º Ed. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

SANTOS-GARCIA, M.O.; KARIA, C.T.; RESENDE, R.M.S.; CHIARI, L.; VIEIRA, M.L.C.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Identification of *Stylosanthes guianensis* varieties using molecular genetic analysis. **AoB Plants**, v. 2, p. 1-14, 2012.

SAS Institute. SAS/STAT guide for personal computers, Version 8.0. **SAS Inst.**, Cary, NC. 2000.

SATAKE, T. Male sterility caused by cooling treatment at the Young micropore stage in rice plants. XXX. Relation between fertilization and the number of engorged pollen grains among spikelet cooled at different pollen development stages. **Japanese Journal of Crop Science**, n.4, p. 523-528, 1991.

SATAKE, T. Sterile type cold injury in paddy rice plants. In: **International Rice Research Institute**, Eds. Climate and Rice. IRRI: Los Banos. p.281-300, 1976.

SATO, Y.; MURAKAMI, T.; FUNATSUKI, H.; MATSUBA, S.; TANIDA, M.; SARUYAMA, H. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. **Journal of Experimental Botany**. v.52, p.145-151. 2001.

SAVIO, F.L.; BOSETTI, F.; ROCHAR, D.S.; SOUSA, F.F.; CHAMMA, H.P.; NOVENBRE, A.D.L.C.; PINHEIRO, J.B. Análise multivariada da divergência genética de genótipos de arroz sob estresse por frio durante a germinação. **VII Congresso Brasileiro de Agroecologia**, p.252-255, 2011.

SECOND, G. Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryzas* pp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme *loci*. **Japanese Journal of Genetics**, v. 57, p. 25–57, 1982.

SHARIFI, P. Evaluation of sixty-eight rice germplasms in cold tolerance at germination stage. **Rice Science**, v. 17, p. 77-81, 2010.

SHARIFI, P. Evaluation on sixty-eight rice germplasms in cold tolerance at germination stage. **Rice Science**, v. 17(1), p. 77–81. 2010.

SHARIFI, P.; AMINPANAH, H. Evaluation eighteen rice genotype in cold tolerance at germination stage. **World Applied Sciences Journal**. v. 11, n. 11, p. 1476-1480, 2010.

SHARIFI, P.; AMINPANAH, H. Evaluation eighteen rice genotypes in cold tolerance at germination stage. **World Applied Science Journal**, v. 11, p. 1476-1480, 2010.

SHINADA, H.; YAMAMOTO, T.; YAMAMOTO, E.; HORI, K.; YONEMARU, J.; MATSUBA, S.; FUJINO, K. Historical changes in population structure during rice breeding programs in the northern limits of rice cultivation. **The Appl Genetics**, v. 127, p.995-1004, 2014.

SILVA E.F.da; MONTALVÀN, R.; ANDO, A. Genealogia dos cultivares brasileiros de arroz de sequeiro. **Bragantia**, v.58, n.2, p. 281-286, 1999.

SONG, Z.; LU, P.B.; ZHU, Y.G.; CHEN, J.K.. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. **New Phytologist**, n.157, p.657-665, 2003.

SOSBAI, Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz Irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. In: **XXX Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado e XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**. RS,177p., 2014.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, J. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento – Plantas**. p. 939-965. 2001.

SOW, M.; NDJIONDJOP, M.N.; SIDO, A.; MARIAC, C.; LAING, M.; BEZANÇON, G. Genetic diversity, population structure and differentiation of rice species from Niger and their potential for rice genetic resources conservation and enhancement. **Genet Resour Crop Evolution**, v.61, p.199-213, 2014.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 86 p. 2002.

STEINER, F.; PINTO JÚNIOR, A.S.; ZOZ, T.; GUIMARÃES, V. F.; DRANSKI, J.A.L.; RHEINHEIMER, A.R. Germinação de sementes de rabanete sob temperaturas adversas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.4, p.430-434, 2009.

STEINMETZ, S.; BRAGA, H. J. Zoneamento de arroz irrigado por época de semeadura nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**. v. 9, n. 3, p. 429-438, 2001.

STHAPIT, B.R.; WITCOMBE, J.R. Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening. **Crop Science**, v.38, p.660-665, 1998.

STHAPIT, B.R.; WITCOMBRE, J.R. Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening. **Crop Science**, v. 38, p. 660-665, 1998.

TANKSLEY, S.D. E McCOUCH, S.R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**. n.227, p. 1063- 1066, 1997.

TEMNYKH, S.; PARK, W.D.; AYES, N.; CARTINHO, S.; HAUCH, N.; LIPOVICH, L.; CHO, Y.G.; ISHII, T.; McCOUCH, S.R. Mapping and genome organization of microsatellite sequence in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associates, and genetic marker potential. **Genome Research**. v.11, p.1441-1452, 2000.

TEMNYKH, S.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHO, S.; HAUCK, N.; LIPOVICH, L.; CHO, Y.G.; ISHII, T.; MCCOUCH, S.R. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 697-712, 2000.

TERRES, A.L.; GALLI, J. Efeitos do frio em cultivares de arroz irrigado no Rio Grande do Sul. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária de Terras Baixas de Clima Temperado, Capão do Leão, RS. **Fundamentos para a cultura do arroz irrigado**. Campinas: Fundação Cargil, p. 83-94, 1985.

TERRES, A.L.; RIBEIRO, A.S.; MACHADO, M.O. Progress in breeding for cold-tolerant semidwarf rice in Rio Grande do Sul, Brazil. In: Temperate Rice Conference, 1994, Yanco. **Proceedings**, v.1, p.43-50. 1994.

THOMSON, M.J.; POLATO, N.R.; PRASETIYONO, J.; TRIJATMIKO, K.R.; SILITONGA, T.S.; MCCOUCH, S.R. Genetic diversity of isolated populations of Indonesian landraces of rice (*Oryza sativa* L.) collected in East Kalimantan on the Island of Borneo. **Rice**, v. 2, p. 80–92, 2009.

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

TORO, E. A. T.; Avaliação de linhagens de arroz (*Oryza sativa* L.) suscetíveis e tolerantes a baixas temperaturas em cruzamentos dialélicos parciais. **Tese** Universidade de São Paulo, 144p. 2006.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.48-55, 2005.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**. v.23, p.48-55, 2005.

VERGARA, B.S. Physiological and morphological adaptability of rice varieties to climate. In: Institute International Rice Research (ed) Climate and rice. **International Rice Research Institute**. p. 67-86, 1976.

VIEIRA, J. Caracterização morfológica e molecular do banco de germoplasma de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) da Epagri. **Tese**. Universidade Federal de Santa Catarina, 115 p. 2007.

WALTER L. C.; STRECK N. A.; ROSA H. T.; MENEGASSI C. A.; KRÜGER B. Mudança climática e seus efeitos na cultura do arroz. **Ciência Rural**. v.40, n.11, p.2411-2428, 2010.

WANG Z, WANG J, WANG F, BAO Y, WU Y, ZHANG H. Genetic control of germination ability under cold stress in rice. **Rice Science**. v.16, n.3, p.173-180. 2009.

WANG, X.; BASIA VINOCUR, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

WANKHADE, S. D.; CORNEJO, M. J.; MATEU-ANDRES, I. Microsatellite marker-based genetic variability in Spanish rice cultivars and landraces. **Spanish Journal of Agricultural Research**. v. 8, n.4, p.995-1004. 2010.

WINFIELD, M. O.; LU, C.; WILSON, I. D.; COGHILL, J. A; EDWARDS, K. J. Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal*, v.8, n.7, p.749-71, 2010.

XIE, R. J.; LI, X.W.; CHAI, M.L.; SONG, L.J.; JIA, H.J.; WU, D.J.; CHEN, M.K.; CHEN, K.M.; ARANZANA, M.J.; GAO, Z.S. Evaluation of the genetic diversity of Asian peach accessions using a selected set of SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 622-629, 2010.

XU, Y.; BEACHELL, H.; MCCOUCH, S.R. A marker-based approach to broadening the genetic base of rice in the USA. **Crop Science**, v. 44, p. 1947-1959, 2004.

YE, C.; FUKAI, S.; GODWIN, D.I.; REINKE, R.; SNELL, P.; SCHILLER, J.; BASNAYAKE, J. Cold tolerance in rice varieties at different growth stages. **Crop Pasture Science**. v.60, p.1-11. 2009.

YOSHIDA T.; YAMADA Y.; SAKAI M.; INGLIS V.; XLE X.J; CHEN S.C.; KRUGER R. The association of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in P-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J Aquat Anim Health**, v.8, p.181-186,1996.

YOSHIDA, M., ABE, J., MORIYAMA, M., SHIMOKAWA, S. AND NAKAMURA, Y. Seasonal changes in the physical state of crown water associated with freezing tolerance in winter wheat. **Physiologia. Plantarum** n.99, p.363–370.1997.

YOSHIDA, S. Fundamentals of rice crop science. Los Baños: **International Rice Research Institute**, cap.1, p.1-63. 1981.

ZHANG, D.; ZHANG, H.; WANG, M.; SUN, J.; QI, Y.; WANG, F.; WEI, X.; HAN, L.; WANG, X.; LI, Z. Genetic structure and differentiation of *Oryza sativa* L. in China revealed by microsatellites. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, p. 1105–1117, 2009.

ZHANG, Z.H.; SU, L.; LI, W.; CHEN, W.; ZHU, Y.G. A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 168, p. 527–534, 2005.

ZHOU, L.; ZENG, Y.; HU, G.; PAN, Y.; YANG, S.; YOU, A.; ZHANG, H.; LI, J.; LO, Z. Characterization and identification of cold tolerant near-isogenic lines in rice. **Breeding Science**. v. 62, n. 2, p. 196-201, 2012.

ZHU, M.; WANG, L.; PAN, Q. Identification and Characterization of a New Blast Resistance Gene Located on Rice Chromosome 1 Through Linkage and Differential Analyses. **Phytopathology**. v. 94, n. 5, 2004.

ZHU, Q., ZHENG, X., LUO, J., GAUT, B. S., GE, S. Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: Severe bottleneck during domestication of rice. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 875-888, 2007.

Anexo

Anexo A - Capítulo II

Caracterização fenotípica de genótipos de arroz para tolerância ao frio no estágio germinativo

Anexo A1. Lista dos 124 genótipos utilizados na caracterização fenotípica para tolerância ao frio na germinação. Embrapa/FAEM/UFPel-CGF, Pelotas-RS, 2015.

Acesso	Genótipo	País de origem	Grupo
1	BR Pelotas	Brasil	<i>Indica</i>
2	IRCTN Skau 337	Índia	<i>Desconhecido</i>
3	Arroz Amarelo e Branco	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
4	SC 608	Brasil	<i>Indica</i>
5	LTB 07011	Brasil	<i>Indica</i>
6	Cica 8	Colômbia	<i>Indica</i>
7	Taquari	Uruguai	<i>Japonica tropical</i>
8	IRCTN Skan 23	Índia	<i>Desconhecido</i>
9	Basmati 370	Índia	<i>Indica</i>
10	Mearim	França	<i>Indica</i>
11	Dawn	EUA	<i>Japonica tropical</i>
12	Supremo 13	Brasil	<i>Indica</i>
13	Sabore	Brasil	<i>Desconhecido</i>
14	BR IRGA 409	Brasil	<i>Indica</i>
15	Qualimax 1	Brasil	<i>Indica</i>
16	IRGA 422 CL	Brasil	<i>Indica</i>
17	BRS 6 Chui	Brasil	<i>Indica</i>
18	Agulhinha Dourado IPAM	Brasil	<i>Desconhecido</i>
19	Cachinho	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
20	AB 09001	Brasil	<i>Indica</i>
21	BRA 050166	Brasil	<i>Indica</i>
22	Epagri 109	Brasil	<i>Indica</i>
23	Tegumento Preto	Brasil	<i>Desconhecido</i>
24	BRS 358(CNAI 9903)	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
25	BRS Querência	Brasil	<i>Indica</i>
26	AB 10004	Brasil	<i>Indica</i>
27	Agulha Ligeiro	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
28	BRA 050067	Brasil	<i>Indica</i>
29	Qualimax	Brasil	<i>Indica</i>
30	BR IRGA 413	Brasil	<i>Indica</i>
31	Agulha Amarelo	Brasil	<i>Indica</i>
32	BRA 040304	Brasil	<i>Indica</i>
33	Epagri 108	Brasil	<i>Indica</i>
34	Arroz da Terra	Desconhecido	<i>Japonica temperado</i>
35	IRGA 416	Brasil	<i>Indica</i>

(Continuação)

Acesso	Genótipo	País de origem	Grupo
36	Catetinho Bolinha	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
37	Epagri 107	Brasil	<i>Indica</i>
38	Cacho Grande	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
39	Bolinha Catetinho	Brasil	<i>Japonica tropical</i>
40	EL PASSO L-144	Uruguai	<i>Indica</i>
41	Empasc 103	Brasil	<i>Indica</i>
42	Palha Murcha	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
43	Bluebelle	USA	<i>Japonica Tropical</i>
44	BRS Atalanta	Brasil	<i>Indica</i>
45	BRS Ligeirinho	Brasil	<i>Indica</i>
46	Sasanishiki	Japão	<i>Japonica temperado</i>
47	IRCTN Tatsumi Mochi	Japão	<i>Japonica temperado</i>
48	SC 606	Brasil	<i>Indica</i>
49	IRCTN China 1039	Filipinas	<i>Desconhecido</i>
50	Ambar	Chile	<i>Japonica temperado</i>
51	BRS Fronteira	Brasil	<i>Japonica</i>
52	IAS 12.9 Formosa	Brasil	<i>Japonica</i>
53	Cateto Amarelo	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
54	Supremo 02	Brasil	<i>Indica</i>
55	BR IRGA 414	Brasil	<i>Indica</i>
56	Nippombari	Japão	<i>Japonica</i>
57	Catetinho	Brasil	<i>Japonica temperada</i>
58	BRS Sinuelo CL	Brasil	<i>Indica</i>
59	IAC 202	Brasil	<i>Japonica tropical</i>
60	BRS Colosso	Brasil	<i>Japonica tropical</i>
61	Amarelinho	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
62	Jasmine	Brasil	<i>Japonica</i>
63	CUARO	Uruguai	<i>Indica</i>
64	SC 4	Brasil	<i>Indica</i>
65	Agulhinha	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
66	Cica 9	Colômbia	<i>Indica</i>
67	IAC	Brasil	<i>Japonica tropical</i>
68	Maravilha	Brasil	<i>Japonica tropical</i>
69	BR IRGA 411	Brasil	<i>Indica</i>
70	Lebonnet	EUA	<i>Indica</i>
71	BRA 050026	Brasil	<i>Indica</i>
72	BRS Pampa	Brasil	<i>Indica</i>
73	Cica 4	Colômbia	<i>Indica</i>
74	BRS Bojuru	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
75	Japones de Varzea	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
76	BRS Agrisul	Brasil	<i>Indica</i>
77	BRA 050142	Brasil	<i>Indica</i>
78	BRA 051267	Brasil	<i>Indica</i>

(Continuação)

Acesso	Genótipo	País de origem	Grupo
79	SC 170	Brasil	<i>Indica</i>
80	Diamante	Chile	<i>Japonica temperado</i>
81	Reetz	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
82	IRCTN K 3006 1-1-1-2	Filipinas	<i>Desconhecido</i>
83	IRGA 417	Brasil	<i>Indica</i>
84	Rexoro	EUA	<i>Desconhecido</i>
85	Agulinha Anão	Brasil	<i>Indica</i>
86	AB 10006	Brasil	<i>Indica</i>
87	BRS Firmeza	Brasil	<i>Indica</i>
88	BRA 050069	Brasil	<i>Indica</i>
89	YN 1905-WL 6221102114	Japão	<i>Japonica temperado</i>
90	Tomoe Mochi	Japão	<i>Japonica temperado</i>
91	BRS AG “Gigante”	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
92	SCS BRS 113 Tio Taka	Brasil	<i>Indica</i>
93	Arroz Pássaro	Brasil	<i>Desconhecido</i>
94	Puitá Inta-CL	Argentina	<i>Indica</i>
95	IRGA 419	Brasil	<i>Indica</i>
96	IRGA 420	Brasil	<i>Indica</i>
97	BRA 051279	Brasil	<i>Indica</i>
98	IRAT 124	Filipinas	<i>Indica</i>
99	Itaquil-A	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
100	EEA 405	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
101	SC 607	Brasil	<i>Indica</i>
102	Cristal	Chile	<i>Indica</i>
103	Rio Grande	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
104	IRCTN HSC 16	Filipinas	<i>Desconhecido</i>
105	IAC 201	Brasil	<i>Japonica tropical</i>
106	Progresso	Brasil	<i>Japonica tropical</i>
107	Arroz Chumbinho	Brasil	<i>Indica</i>
108	BRA 050054	Brasil	<i>Indica</i>
109	Agulhinha Branco	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
110	Metica 1	Colômbia	<i>Indica</i>
111	Zebu	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
112	New Bonnet	EUA	<i>Japonica tropical</i>
113	BRA 02665	Brasil	<i>Indica</i>
114	BRS IRGA 412	Brasil	<i>Indica</i>
115	BRA 050106	Brasil	<i>Indica</i>
116	SC 173	Brasil	<i>Indica</i>
117	ARROZ Sequeiro	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
118	Oryzica 1	Colômbia	<i>Indica</i>
119	BRS 7 Taim	Brasil	<i>Indica</i>
120	Agulha	Brasil	<i>Japonica temperado</i>
121	Brilhante ^a	Chile	<i>Japonica temperado</i>

(Continuação)

Acesso	Genótipo	País de origem	Grupo
122	Oro ^b	Chile	<i>Japonica temperado</i>
123	IR8 ^c	Filipinas	<i>Indica</i>
124	BR IRGA 410 ^d	Brasil	<i>Indica</i>

Tolerantes: a:121 (Brilhante); b: **122** (Oro);

Sensíveis: c: **123** (IR8); d: **124** (IRGA 410)

Anexo B - Capítulo III

Avaliação da variabilidade genética em germoplasma de arroz utilizando marcadores moleculares SSR

Anexo B1. Genótipos de arroz utilizados para a genotipagem utilizando nove *loci* SSR. Embrapa/CGF/ UFPel, 2015.

Acessos	Genótipo	País de origem	Cultivo	Genitores
001.I	AB 09001	Brasil	Irrigado	BRS 7Taim/Jasmine
002.I	AB 10006	Brasil	Irrigado	BRS Atalanta / BRA 01010
003.I	AB 10004	Brasil	Irrigado	BRS Firmeza/Epagri 109
004.JT	AGULHA	Brasil	Facultativo	Sem informação
005.I	Agulha Amarelo	Brasil	Facultativo	Sem informação
006.JT	Agulha Ligeiro	Brasil	Sequeiro	Sem informação
007.JT	Agulhinha	Brasil	Facultativo	Sem informação
008.I	Agulhinha Anão	Brasil	Facultativo	Sem informação
009.JT	Agulhinha Branco	Brasil	Sequeiro	Sem informação
010.SI	Agulhinha Dourado IPAM	Brasil	Sequeiro	Sem informação
011.JT	Amarelão-A	Brasil	Sequeiro	Sem informação
012.JT	Amarelinho	Brasil	Facultativo	Sem informação
013.JT	Amarelo Bico Preto	Brasil	Sequeiro	Sem informação
014.JT	Ambar	Chile	Irrigado	Sem informação
015.JT	Arroz Amarelo e Branco	Brasil	Facultativo	Sem informação
016.JT	Arroz Carolino	Brasil	Irrigado	Sem informação
017.I	Arroz Chumbinho	Brasil	Facultativo	Sem informação
018.JT	Arroz de seco	Brasil	Sequeiro	Sem informação
019.SI	ARROZ Pássaro	Brasil	Facultativo	Sem informação
020.JT	ARROZ Sequeiro	Brasil	Sequeiro	Sem informação
021.JT	Arroz Da Terra	Desconhecido	Sequeiro	Sem informação

(Continuação)

Acessos	Genótipo	País de origem	Cultivo	Genitores
022./	Basmati 370	Índia	Irrigado	Sem informação
023.JT	Bico Preto	Brasil	Irrigado	Sem informação
024.JT	Bico Torto	Brasil	Irrigado	Sem informação
025.JTL	Bluebonnete	EUA	Sequeiro	Rexoro/Fortuna
026.JTL	Bolinha Catetinho	Brasil	Facultativo	Sem informação
027./	BRA 01059	Brasil	Irrigado	CL Sel. 447-B-B/TF 528
028./	BRA 02665	Brasil	Irrigado	Sem informação
029./	BRA 040075	Brasil	Irrigado	Sem informação
030./	BRA 040304	Brasil	Irrigado	TAIM/CNAi9050
031./	BRA 050026	Brasil	Irrigado	CNA 8621/CNAi 9025
032./	BRA 050054	Brasil	Irrigado	CNA 8621/CNAi 9025
033./	BRA 050067	Brasil	Irrigado	SCS-BRS-111/CNAi 9018
034./	BRA 050069	Brasil	Irrigado	SCS-BRS-111/CNAi 9018
035./	BRA 050106	Brasil	Irrigado	TF 448 / BR IRGA 413
036./	BRA 050108	Brasil	Irrigado	IR 22/ CNA8502
037./	BRA 050142	Brasil	Irrigado	BRS 7Taim/CL Sel 4
038./	BRA 050166	Brasil	Irrigado	BRS 7Taim / Basmati
039./	BRA 051267	Brasil	Irrigado	CNAi9050/IRGA 417
040./	BRA 051279	Brasil	Irrigado	JAVAÉ/CNAi9039
041.JT	Brilhante	Chile	Irrigado	Diamante/Ñiquén
042./	BRS Agrisul	Brasil	Irrigado	linhagem P 789/linhagem CL seleção 49-2
043.JT	BRS Bojuru	Brasil	Irrigado	Seleção da população TY-12
044.JTL	BRS Bonança	Brasil	Sequeiro	CT7244-9-2-1-52-1/CT7232-5-3-7-2-1P//CT6196-33-11-1-3-AP
045.JTL	BRS Colosso	Brasil	Sequeiro	Seleção da população TY-12
046.JTL	BRS Conai	Brasil	Sequeiro	Sem informação
047.JTL	BRS Curinga	Brasil	Sequeiro	Sem informação
048./	BRS Atalanta	Brasil	Irrigado	Linhagem P 798 /linhagem CI

(Continuação)

Acessos	Genótipo	País de origem	Cultivo	Genitores
049./	BRS Firmeza	Brasil	Irrigado	BR-IRGA 411/Bluebelle//Lemont
050.JTL	BRS Formoso	Brasil	Sequeiro	17719/5738//IR21015-71-3-3-1
051.JTL	BRS Liderança	Brasil	Sequeiro	Sem informação
052./	BRS Ligeirinho	Brasil	Sequeiro	seleção BR IRGA 410
053.JTL	BRS Primavera	Brasil	Sequeiro	Sem informação
054.JTL	BRS Talento	Brasil	Sequeiro	Seleção dentro da linhagem CT11257-7-2-n-n
055.JTL	BRS Vencedora	Brasil	Sequeiro	Sem informação
056./	BRS Pelota	Brasil	Irrigado	Seleção em BR IRGA 410
057./	BRS Sinuelo CL	Brasil	Irrigado	Taim/As 3510///Taim
058./	BRS 6 CHUI	Brasil	Irrigado	Sel. em BR-IRGA 410
059./	BRS 7-Taim	Brasil	Irrigado	Bellmont/New Rex
060./	BRS Querência	Brasil	Irrigado	CL 246 / ZHO FEE nº10
061.JT	Cachinho	Brasil	Irrigado	Sem informação
062.JT	Cacho Grande	Brasil	Sequeiro	Sem informação
063.JT	Cana Roxa	Brasil	Sequeiro	Sem informação
064.JTL	Carolina	USA	Sequeiro	Sem informação
065.JT	Catetinho	Brasil	Irrigado	Sem informação
066.JT	Catetinho Bolinha	Brasil	Sequeiro	Sem informação
067.JT	Cateto Amarelo	Brasil	Irrigado	Sem informação
068.JT	Cateto Coleta	Brasil	Irrigado	Sem informação
069./	Cica 4	Colômbia	Irrigado	IR 8/ IR 12-178-2-3
070./	Cica 7	Colômbia	Irrigado	IR 262/ Remadja / BG 90-2
071./	Cica 8	Colômbia	Irrigado	Cica 4 / IR 665-23-3 / Te Tep
072./	Cica 9	Colômbia	Irrigado	IR 841-63-5-104-1B/C 46-15 / IR 665-23-3-1
073.JT	BRs 358 (CNAI 9903)	Brasil	Irrigado	Giza 178 -cultivar introduzida do Egito -oriunda o cruzamento GIZA 175/MILYANG 49
074./	Cristal	Chile	Irrigado	Sem informação
075./	Cuaro	Uruguai	Irrigado	Sem informação

(Continuação)

Acessos	Genótipo	País de origem	Cultivo	Genitores
076.JTL	Dawn	EUA	Irrigado	CenturyPatna 231/HO 12-1-1
077.JT	Diamante	Chile	Sequeiro	SIGADIS2/ TN 1 // IR24
078.JT	EEA 405	Brasil	Irrigado	Prolific/Novelli
079.I	Empasc 103	Brasil	Irrigado	IR 262-43-8-11/KDM 105
080.I	Empasc 104	Brasil	Irrigado	IAC 22/Salumpikit
081.I	Epagri 107	Brasil	Irrigado	Cica4//BG-90-2/Cica7
082.I	Epagri 108	Brasil	Irrigado	CT 7347// IR21015-72-3-3-3-1
083.I	Epagri 109	Brasil	Irrigado	CT 7347 / IR 21015-72-3-3-3-1
084.JT	Fortuna Peluda	Brasil	Facultativo	Desconhecido
085.JT	BRS AG "Gigante"	Brasil	Irrigado	Gulfmont / linhagem SLG1
086.JTL	IAC 201	Brasil	Irrigado	IAC 165 / Labelle
087.JTL	IAC 202	Brasil	Irrigado	Lemont / IAC 25
088.JTL	IAC 500	Brasil	Irrigado	IAC 165/ Labelle
089.I	IR 8	Filipinas	Irrigado	Dee-geo-woo-gen/Peta
090.I	IRAT 124	Filipinas	Irrigado	Sem informação
091.SI	IRCTN China 1039	Filipinas	Irrigado	Sem informação
092.SI	IRCTN HSC 16	Filipinas	Irrigado	Sem informação
093.SI	IRCTNK 3006 1-1-1-2	Filipinas	Irrigado	Sem informação
094.SI	IRCTN Skan 23	Filipinas	Irrigado	K 21-9-10-1/SR 2053-521-1-2
095.I	IRGA 416	Brasil	Irrigado	IR841-67-1-1 / BR-IRGA 409
096.I	H 4- AB 10101	Brasil	Irrigado	genitores Embrapa (Híbrido)
097.I	Puitá Inta-CL	Argentina	Irrigado	mutante IRGA 417
098.I	BR IRGA 409	Brasil	Irrigado	IR930-2 / IR 665-31-2-4
099.I	BR IRGA 410	Brasil	Irrigado	IR 930-53/IR 665-31-2-4
100.I	IRGA 417	Brasil	Irrigado	New Rex / IR 19743-25-2-2 // BR-IRGA 409
101.I	IRGA 418	Brasil	Irrigado	BR IRGA 412 / Cica 9 // BR IRGA 409
102.I	IRGA 422CL	Brasil	Irrigado	IRGA 417/linhagem
103.I	IRGA 419	Brasil	Irrigado	Oryzica 1 / BR-IRGA 409

(Continuação)

Acessos	Genótipo	País de origem	Cultivo	Genitores
104./	IRGA 420	Brasil	Irrigado	Oryzica 1 / BR-IRGA 412
105.JT	Itaqui-A	Brasil	Irrigado	Sem informação
106.JT	JaponesB-Liso	Brasil	Irrigado	Sem informação
107.JT	Japones De Varzea	Brasil	Irrigado	Sem informação
108./	IRGA 425	Brasil	Irrigado	IRGA 1598-3-27-1-4-1/Epagri 108
109./	IRGA 426	Brasil	Irrigado	IRGA 411-1-6-1F-A/IRGA 976-4-6-1F-1-1-1/IRGA 417
110./	L144-El Passo	Uruguai	Irrigado	IR 930-2/IR 665-31-2-4
111.JTL	Lacassine	EUA	Irrigado	Newbonnet/Lemont
112./	Lebonnet	EUA	Irrigado	Bluebelle/Belle PatnaDawn
113.JTL	Lemont	EUA	Irrigado	Lebonnet/CI9881/ PI331581
114./	LTB 07011	Brasil	Irrigado	Sel TB0701-14B/BRS Pelotas
115.JT	Meio Cumbinho	Brasil	Irrigado	TOX1010-49-1/IRT121//Colômbia 1///N312A
116./	Metica1	Colômbia	Irrigado	Mutantes da linhagem TOM 1-3
117.JT	Mogi	Brasil	Irrigado	IR930-53, IR579-160, IR930-147-8, IR930-31-10, IR662 e Colômbia
118.JT	Montanha 90 Dias	Brasil	Irrigado	Sem informação
119.JTL	New Bonnet	EUA	Irrigado	Dawn/ Bonnet 73
120.SI	OR 63-252	IRRI	Irrigado	KUMAR/ JAGANNAT
121.JT	ORO	Chile	Irrigado	Sem informação
122./	Oryzica1	Colômbia	Irrigado	Sinawpagh/81B-25/variedade desconhecida/Shoemed
123.JR	Palha Murcha	Brasil	Irrigado	Sem informação
124.JTL	Progresso	Brasil	Irrigado	Colômbia 1/ N312A//IRAT 124// RHS107
125./	Qualymax	Brasil	Irrigado	Colombia1
126./	Qualimax 1	Brasil	Irrigado	Colombia2
127.SI	Rexoro	EUA	Irrigado	Sem informação
128.JT	Rio Grande	Brasil	Irrigado	Sem informação

(Continuação)

Acessos	Genótipo	País de origem	Cultivo	Genitores
129.SI	SABORE	Brasil	Irrigado	Sem informação
130.JT	Sasanishiki	Japão	Irrigado	OU 224 / TOHOKU 54
131.I	SC 170	Brasil	Irrigado	Sem informação
132.I	SC 173	Brasil	Irrigado	Sem informação
133.I	SC-4	Brasil	Irrigado	Sem informação
134.I	SC 606	Brasil	Irrigado	Sem informação
135.I	SC 607	Brasil	Irrigado	Sem informação
136.I	SCSBRS 113 Tio Taka	Brasil	Irrigado	Seleção recorrente
137.I	Supremo 02	Brasil	Irrigado	Sem informação
138.I	Supremo 13	Brasil	Irrigado	Sem informação
139.JTL	Taquarl	Uruguai	Irrigado	New Bonnet/New Rex L 79
140.SI	Tegumento Preto	Brasil	Irrigado	Sem informação
141.I	Tetep	Vietna	Irrigado	Sem informação
142.JT	Tomoe Mochi	Japão	Irrigado	Sem informação
143.SI	TOX 541-16-101-1	Nigéria	Sequeiro	Sem informação
144.JT	Yamada Nishik	Japão	Irrigado	Sem informação
145.JT	YN 1905-WL 6221102114	Japão	Irrigado	Sem informação
146.JT	Zebu	Brasil	Sequeiro	Sem informação
147.I	BR IRGA 413	Brasil	Irrigado	IR930-2 / IR 665-31-2-4
148.I	BR IRGA 412	Brasil	Irrigado	Seleção BR IRGA 409
149.I	BR IRGA 411	Brasil	Irrigado	IRGA 407/Dawn
150.I	BR IRGA 414	Brasil	Irrigado	Linhagem P 793-B4-38-1T (IR 930-2/IR 665-31-7-4), procedente da Colômbia-CIAT
151.JTL	Maravilha	Brasil	Sequeiro	TOX1010-49-1/IRAT121//Colômbia 1///N312A

*Identificação dos grupos dos genótipos:

I = *indica* ;

JT = *japonica* temperado;

JTL= *japonica* tropical e

SI = Sem identificação.

VITA

Daisy Letícia Ramirez Monzón, nasceu em 29 de novembro de 1985, em Assunção- Paraguai. Completou o Ensino Fundamental no Colégio Nacional de Niñas Assunção- Paraguai, e o Ensino Médio no Colégio Técnico Nacional (Técnico em Eletrônico) Assunção- Paraguai. É Engenheiro Agrônomo, formado pela Facultad de Nacional de Asunción/FCA (2004-2009), sendo o trabalho de conclusão de curso intitulado como, Comportamiento productivo de diferentes materiales forrajeros del genero *Brachiaria* sometidas a fertilización básica (N, P, K) San Lorenzo- Paraguai, sob orientação da Prof.Eng. Agr. MsC. Angel Iribas Zarate. Durante a graduação realizou estágio no Centro Tecnológico Agropecuario en Paraguay (CETAPAR) com pastagem para engorde de gado de carne. Desde 2010, foi aluna regular do Programa de Pós – graduação em ciência e Tecnologia de Sementes na área de concentração Fitotecnia, como bolsita do Instituto de Biotecnologia Agrícola (INBIO) Paraguai. Neste período, participou das atividades de pesquisa do Programa de sementes. Desde 2012, foi aluna regular do Programa de Pós – graduação em Agronomia em pareceria com a Embrapa Clima Temperado, atuando principalmente nas atividades de tolerância a frio em genótipos de arroz e no laboratório de Biologia Molecular, trabalhando com marcadores microssatélites, sob orientação da pesquisadora e prof. Dra. Caroline M. Castro e do pesquisador e prof. Dr. Ariano Martins de Magalhães Jr.