

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Mapeamento associativo para tolerância à salinidade em germoplasma de
arroz utilizado no Brasil**

Victoria Freitas de Oliveira

Pelotas, 2019

Victoria Freitas de Oliveira

Mapeamento associativo para tolerância à salinidade em germoplasma de arroz utilizado no Brasil

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

Orientadora: Camila Pegoraro, Dr.

Co-orientador: Eduardo Venske, Dr.

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O48 Oliveira, Victoria Freitas De

Mapeamento associativo para tolerância à salinidade em germoplasma de arroz utilizado no Brasil / Victoria Freitas De Oliveira ; Camila Pegoraro, orientadora ; Eduardo Venske, coorientador. — Pelotas, 2019.

88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Oryza sativa L.. 2. Associação genômica ampla. 3. Estresses abióticos. 4. Variabilidade genética. I. Pegoraro, Camila, orient. II. Venske, Eduardo, coorient. III. Título.

CDD : 633.18

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca Examinadora:

Dra. Camila Pegoraro, FAEM/UFPeI (Presidente)

Dra. Adriana Pires Soares Bresolin, UNIPAMPA

Dr. Ariano Martins de Magalhães Júnior, Embrapa

Dr. Cesar Valmor Rombaldi, FAEM/UFPeI

“Dedico aos meus pais, a toda a minha família, aos meus amigos e todas as pessoas especiais que ajudaram de alguma forma para a realização dessa etapa”.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por sempre conceder luz no meu caminho, fé para superar todos os obstáculos encontrados, força em todos os momentos, especialmente nos difíceis, e saúde e paz para que eu pudesse seguir o meu caminho com dignidade.

Aos meus pais Antonio Costa de Oliveira e Carla Sampaio Freitas de Oliveira por serem os pilares e a base da minha vida, por todo o amor, carinho, apoio e pelo incentivo para que eu jamais desistisse dos meus objetivos e dos meus sonhos, meu eterno obrigado.

Ao meu irmão Eduardo Freitas de Oliveira, por ser o melhor companheiro de caminhada de decisões e alegrias, e por me incentivar a cada passo do meu futuro, vibrando em cada vitória.

Aos meus familiares, por todo o apoio, por me acompanharem, vibrando e comemorando comigo todas as conquistas, por serem meu chão e por esbanjarem muito carinho ao longo da minha vida.

Aos meus amigos do laboratório Cíntia Garcia, Jennifer Lopes, Liamara Thurow, Tiago Corazza, Stefânia Zenker e Raíssa Martins pela amizade, pelo carinho, pela ajuda no experimento, pela motivação e por compartilharem todas as alegrias e angústia. Meu muito obrigada por tornarem a vida mais alegre diariamente.

Aos meus amigos da graduação Alisson Pagnussatt, Eduardo Valmorbida, Francisco Seger, João Vicente Bazzan, Jonas Gularte, Máira Moura e Rodrigo Hernandez, e pela amiga desde a época do colégio Juliana Rosinha, pelo incentivo, palavras que confortam e pelos encontros menos frequentes mas cheios de amor e saudade, permanecendo a mesma amizade de anos.

Aos meus amigos e estagiários Alice Pereira, Jean Louzada, Luciana Schroeder, Matheus Meyer e Silvana Rosa, pelo auxílio no experimento, pelo companheirismo, amizade, pelo apoio, por comemorarem comigo as vitórias e por todos os momentos alegres que passamos juntos que vão ficar no meu coração.

A minha orientadora Prof. Dra. Camila Pegoraro por clarear minhas ideias, pela disposição, por todo apoio, pela confiança para seguir me orientando no doutorado, pela ajuda no experimento e sempre contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador Eduardo Venske, pela paciência, por ir atrás de componentes necessários para a realização do experimento, pela ajuda em todas as etapas, análises e escrita, pela disposição e por todos os conhecimentos transmitidos no mestrado, experiências, incentivo e amizade.

Aos meus colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) e aos professores, por esses sete anos de convivência, por terem me transmitido tanto conhecimento e auxiliando no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/FAEM-UFPel pela oportunidade do curso de mestrado e seguir no doutorado, e ao CNPq pelo financiamento da bolsa. Ainda, ao CNPq (nº 401902 / 2016-1) pelo financiamento para execução dos experimentos.

A Embrapa pelo fornecimento das sementes e pelo auxílio na execução dos experimentos localizados no campo experimental na estação de terras baixas.

Finalmente à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) que ofertou grande parte do conhecimento para a minha formação como engenheira agrônoma e no curso de mestrado, me preparando para alcançar a realização profissional.

Obrigada.

*“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos
gigantes”
(Isaac Newton)*

Resumo

OLIVEIRA, Victoria Freitas de. **Mapeamento associativo para tolerância a salinidade em germoplasma de arroz utilizado no Brasil**. 2019. 86f. Dissertação (Mestrado em agronomia – área de concentração: Fitomelhoramento) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2019.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos três principais cereais cultivados e é considerado alimento básico para a maioria da população mundial. Elevar a produtividade é importante para lidar com a alta demanda pelo cereal. No entanto, a produtividade fica limitada quando a cultura é exposta a estresses causados por agentes abióticos e bióticos. A salinidade é um fator ambiental que prejudica o desenvolvimento e crescimento da maioria das plantas, provocando uma série de modificações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas. Essa condição afeta milhões de hectares de solo irrigado para o cultivo de arroz no mundo, e também no Brasil. Devido a tolerância à salinidade ser uma característica quantitativa, e devido as plantas apresentarem diferentes respostas nos distintos estádios de desenvolvimento, se torna uma característica complexa, e representa um desafio para os pesquisadores que almejam a identificação de genes responsáveis por esse mecanismo. A busca por genótipos tolerantes é essencial para mitigar o problema e o conhecimento da base genética da tolerância potencializa o processo de melhoramento. Técnicas de biologia molecular, tais como mapeamento genético utilizando marcadores moleculares, apresentam enorme potencial para atingir esse objetivo. Dentre elas, o mapeamento associativo ou estudo de associação genômica ampla é eficiente quando aplicado em caracteres complexos, uma vez que detecta variantes genéticas em vários locos ao mesmo tempo, podendo, nesse caso, encontrar genes relacionados à tolerância a salinidade. Desta forma, o objetivo deste estudo foi mapear regiões genômicas associadas à tolerância à salinidade em genótipos de arroz cultivados e utilizados em programas de melhoramento no Brasil. Um total de 94 acessos de arroz foram utilizados para amostrar a variabilidade genética do germoplasma elite brasileiro. O DNA de cada acesso foi enviado para o laboratório do IRRI nas Filipinas para genotipagem. A fenotipagem foi feita no Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento, em tanque hidropônico utilizando dose de 40mM de NaCl para indução de estresse salino. Para análise dos dados foi utilizado o programa Tassel V.5.2.41. A variabilidade genética encontrada representa um valor baixo, e isso é devido ao painel ser composto basicamente por acessos elite de arroz brasileiros. O desequilíbrio de ligação apresentou uma queda lenta, sendo esperada, já que o arroz é uma planta autógama e também decorrente da estreita variabilidade genética disponível. Para a estrutura da população houve a formação de oito subpopulações, sendo o agrupamento dos acessos feito em grande maioria de acordo com os programas de melhoramento genético em que foram desenvolvidos. O estudo de associação genômica ampla possibilitou o mapeamento de sete QTNs associados a resposta à salinidade. Dois QTNs localizados nos cromossomos 6 e 10, associados ao comprimento de parte aérea, um QTN localizado no cromossomo 9, associado ao comprimento de raiz, um QTN localizado no cromossomo 11, associado à massa seca de parte aérea e três QTNs localizados nos cromossomos 5 e 9, associados a massa seca de raiz. Com base nos resultados obtidos conclui-se que o painel de arroz

estudado pode ser aplicado em estudos de associação genômica ampla e os sete QTNs identificados trazem indícios de QTLs subjacentes associados à resposta à salinidade em plântulas de arroz.

Palavras-Chave: Associação genômica ampla, *Oryza sativa* L., estresses abióticos, variabilidade genética, estrutura da população.

Abstract

OLIVEIRA, Victoria Freitas de. **Association mapping for salinity tolerance in rice germplasm used in Brazil.** 2019. 86f. Dissertation (Master's degree in Agronomy – concentration area: Plant Breeding) – Graduate Program in Agronomy, Department of Crop Science, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2019.

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the three major cereals grown and is termed as staple food for the majority of the population worldwide. Rising the yield is important to cope with the high demand for this cereal. However, the yield is limited when the crop is exposed caused by agents to abiotic and biotic stresses. Salinity is an environmental factor that impairs mostly the plant growth and development, causing a series of molecular, biochemical, physiological and morphological changes. This condition affects millions of hectares of irrigated rice all around the world and also in Brazil. Because salinity tolerance is a quantitative trait, and due plants present different responses at the different stages of development, it becomes a complex trait, and represents a challenge for researchers that aim to identify the genes responsible for this mechanism. The search for tolerant genotypes is essential to mitigate this problem and the understanding of the genetic basis of tolerance enhances the breeding process. Molecular biology techniques, such as genetic mapping using molecular markers present enormous potential to reach this goal. Association mapping or genome-wide association studies (GWAS) is efficient when applied to complex traits, since they detect genetic variants simultaneously at several loci, therefore, being able to find genes related to salinity tolerance. Thus, the aim of this study was to map the genomic regions associated to salinity tolerance in rice genotypes grown and used in breeding programs in Brazil. A total of 94 rice accessions were used to sample the genetic diversity of the Brazilian elite germplasm. The DNA of each access was sent to IRRI in the Philippines for genotyping. Phenotyping was scored at the Plant Genomics and Breeding Center, at a hydroponic tank using 40mM NaCl in order to induce the salinity stress. The data analysis was performed with the aid of Tassel V.5.2.41 software. The low genetic diversity found was expected, since the panel was basically composed by Brazilian elite rice accessions. The linkage disequilibrium decay presented a gentle slope, which could be expected, since rice is an autogamous plant and also due to the narrow genetic diversity available. For the population structure, eight subpopulations were formed, and the grouping of these accessions was performed mostly according to the breeding program in which they were developed. The genome-wide association study allowed to mapping seven QTNs associated with salinity response. Two QTNs located in the chromosomes 6 and 10 associated with shoot length, one QTN located in the chromosome 9 associated with root length, one QTN located in the chromosome 11, associated with shoot dry mass and three QTNs located in the chromosomes 5 and 9 associated with root dry mass. Based on the results obtained it is concluded that the rice panel studied can be applied in genome-wide association studies and the seven QTNs identified bring evidence of underlying QTLs associated with salinity response in rice seedlings.

Key- Words: GWAS, *Oryza sativa* L., abiotic stresses, genetic variability, population structure.

Lista de Figuras

2 Revisão Bibliográfica

Figura 1	Mecanismos de resposta das plantas ao estresse salino.....	26
Figura 2	Mecanismos de percepção do componente osmótico do estresse salino pelas plantas. A - Percepção do componente osmótico do estresse salino por AtHK1 (Histidina quinase de <i>Arabidosis thaliana</i>) presente no plasmalema e ativação do processo de transdução de sinal. B – Percepção do componente osmótico do estresse salino por canais iônicos e ativação do processo de transdução de sinal.....	29
Figura 3	Sinalização ABA dependente e ABA independente.....	30
Figura 4	Mecanismo de percepção do componente iônico do estresse salino pelas plantas.....	31
Figura 5	Síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs). A – Síntese de diferentes moléculas EROs. B – Diferentes locais de síntese de EROs nas células.....	32

CAPÍTULO I - Variabilidade genética, desequilíbrio de ligação e estrutura populacional em painel de arroz brasileiro

Figura 1	Gráfico de declínio do desequilíbrio de ligação entre locos ao longo do genoma, para 93 acessos de arroz avaliados para 4973 locos SNP.....	60
Figura 2	Estrutura genética da população de acessos de arroz estudados obtida através do agrupamento Bayesiano. O número de acessos de cada subgrupo formado está demonstrado entre parênteses – para um acesso ser considerado como pertencente a um grupo este deve apresentar no mínimo 60% da sua composição genotípica característica deste grupo, conforme linha traçada.	

	Genótipos que não apresentam este critério são considerados de constituição genética mista.....	61
Figura 3	Análise de componentes principais para 93 acessos de arroz avaliados em 4973 locos SNP.....	64
Figura 4	Árvore filogenética sem raiz baseada em matriz de distâncias pelo parâmetro identidade por estado e método de agrupamento do vizinho mais próximo. As cores dos ramos na árvore filogenética seguem os resultados do agrupamento Bayesiano.....	64

CAPÍTULO II - Mapeamento associativo para tolerância à salinidade em uma amostra de arroz do germoplasma brasileiro

Figura 1	Gráfico de Manhattan plot para a associação caractere – SNP quanto ao desempenho relativo entre as condições de controle e estresse, para comprimento de parte aérea. As setas mostram os SNPs mais significativos.....	78
Figura 2	Gráfico de Manhattan plot para a associação caractere – SNP quanto ao desempenho relativo entre as condições de controle e estresse, para comprimento de raiz. A seta mostra o SNP mais significativo.....	79
Figura 3	Gráfico de Manhattan plot para a associação caractere – SNP quanto ao desempenho relativo entre as condições de controle e estresse, para massa seca de parte aérea. A seta mostra o SNP mais significativo.....	80
Figura 4	Gráfico de Manhattan plot para a associação caractere – SNP quanto ao desempenho relativo entre as condições de controle e estresse, para a massa seca de raiz. As setas mostram os SNPs mais significativos.....	81

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I - Variabilidade genética, desequilíbrio de ligação e estrutura populacional em painel de arroz brasileiro

Tabela 1	Características dos 94 acessos de arroz que compõe o painel estudado.....	52
Tabela 2	Resumo das estatísticas genotípicas nos 4973 SNPs analisados que foram filtrados em um painel com 93 acessos de arroz.....	59
Tabela 3	Estrutura da população dos acessos de arroz de acordo com o agrupamento Bayesiano.....	61

Sumário

Resumo.....	8
Abstract.....	10
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 Revisão Bibliográfica.....	20
2.1 Aspectos genéticos e morfológicos da cultura do arroz.....	21
2.2 Importância econômica do arroz.....	22
2.3 Efeito dos estresses abióticos no arroz.....	23
2.4 O problema da salinização.....	24
2.5 Estresse salino.....	26
2.6 Sinalização celular sob estresse salino.....	27
2.7 Outras mudanças metabólicas sob condição de estresse salino.....	31
2.8 Mecanismos de tolerância e que evitam a salinidade.....	33
2.9 Estratégias de Melhoria para tolerância a salinidade.....	34
2.10 Referências Bibliográficas.....	37
3 CAPÍTULO I - Variabilidade genética, desequilíbrio de ligação e estrutura populacional em painel de arroz brasileiro.....	47
3.1 Introdução.....	48
3.2 Material e Métodos.....	50
3.2.1 Germoplasma.....	50
3.2.2 Genotipagem e análise dos dados.....	56
3.3 Resultados e Discussão.....	57
3.4 Conclusões.....	65
3.5 Referências Bibliográficas.....	65
4 CAPÍTULO II - Mapeamento associativo para tolerância à salinidade em uma amostra de arroz do germoplasma brasileiro.....	70
4.1 Introdução.....	71
4.2 Material e Métodos.....	72
4.2.1 Germoplasma.....	73
4.2.2 Genotipagem.....	73

4.2.3 Fenotipagem.....	74
4.2.4 Análise do Mapeamento Associativo.....	76
4.3 Resultados e Discussão.....	76
4.4 Conclusões.....	81
4.5 Agradecimentos.....	82
4.6 Referências Bibliográficas.....	82
5 Considerações Finais.....	86
6 Referências da Introdução Geral.....	88

1 INTRODUÇÃO GERAL

É amplamente reconhecido que o arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas alimentares para mais de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo, estando diretamente associado com a segurança alimentar (LI et al., 2018). Ainda, o cereal é considerado planta modelo para estudos de genômica funcional por apresentar genoma pequeno e relativamente simples, permitindo um sequenciamento de alta qualidade, colinearidade com sequências de outros cereais, alta eficiência de transformação e abundante fonte de germoplasma (JIANG et al., 2012). O Brasil é o nono produtor mundial de arroz (FAO, 2018), e para safra 2018/2019 há uma estimativa de produção de 11,2 milhões de toneladas, com produtividade média de 6,1 ton ha⁻¹ em uma área de 1,8 milhões de hectares, da qual 74% correspondem ao cultivo irrigado. A estimativa é que o Rio Grande do Sul (RS), principal produtor do país, apresente uma produção de 7,8 milhões de toneladas, cultivados no sistema irrigado (CONAB, 2018).

O cenário atual prevê um aumento na demanda de arroz, decorrente do constante crescimento da população, assim um dos principais objetivos do melhoramento genético é o aumento do potencial produtivo. No entanto, a intensificação dos estresses abióticos devido às mudanças climáticas, causa perdas significativas na produtividade, fazendo com que a tolerância às condições ambientais adversas também seja uma característica alvo dos melhoristas. No RS, diferentes estresses abióticos impactam negativamente a produtividade do arroz, sendo a salinidade uma das condições adversas mais comuns.

O sistema de cultivo de arroz utilizado no RS é o irrigado por inundação, com manutenção de lâmina d'água, proveniente de rios, córregos, lagos, lagoas e reservatórios de águas subterrâneas. A Lagoa dos Patos é importante fonte de água de irrigação para as lavouras de arroz da região Sul e da Planície Costeira. Nos meses mais quentes do ano (novembro a fevereiro), com baixa pluviosidade e alta demanda de água para irrigação dos campos de arroz ocorre uma diminuição do nível de água da Lagoa. A ligação da Lagoa ao Oceano Atlântico permite a entrada de água salgada, resultando no aumento da concentração de sais, muitas vezes prejudicial à cultura, podendo atingir uma grande área de cultivo (revisado por FRAGA et al., 2010).

Por definição, a salinidade ocorre quando há uma alta concentração de sais solúveis, e um solo salino é aquele que apresenta condutividade elétrica de 4dS m^{-1} (aproximadamente $\text{NaCl } 40\text{ mM}$). O limiar do arroz para o estresse salino é de 3dS m^{-1} , com uma redução de 12% no rendimento, por dS m^{-1} , além deste valor, o que o torna uma cultura sensível ao sal. A sensibilidade do arroz ao sal varia de acordo com o estágio de desenvolvimento, sendo a germinação o estágio em que a planta apresenta maior tolerância. No estágio de plântula se torna sensível à salinidade, e no estágio vegetativo recupera a tolerância. Depois no estágio reprodutivo se caracteriza pela maior sensibilidade da planta ao estresse salino (revisado por NEGRÃO et al., 2011).

Em solo salino, as plantas de arroz passam por estresse osmótico devido à redução do potencial osmótico da solução do solo, resultando na reduzida captação de água, gerando efeito similar ao dano ocasionado pela seca. A exposição à salinidade também causa acúmulo de sais em tecidos das plantas, podendo alcançar níveis tóxicos para estas, especialmente em folhas mais velhas, causando toxicidade por Na^+ , caracterizando o estresse iônico, reduzindo a captação de nutrientes ou causando desequilíbrio nutricional (revisado por CASTILLO et al., 2007).

Após exposição ao sal, o estresse osmótico provoca desaceleração da transpiração e expansão foliar. Ao mesmo tempo, os transportadores restringem a entrada de Na^+ nas raízes, e outros transportadores removem Na^+ da corrente que flui para a parte aérea. O Na^+ que resta atinge as folhas completamente expandidas e acumula-se lentamente, até que essas folhas entrem em senescência de modo prematuro. Esse processo pode ser retardado pela remoção de Na^+ para o vacúolo, no entanto, o declínio da superfície fotossintética reduz o crescimento da planta, podendo leva-la a morte. Na toxicidade iônica ocorre a substituição de K^+ por Na^+ em reações bioquímicas, bem como mudanças na conformação e perda de função de proteínas quando os íons Na^+ e Cl^- interferem nas interações não covalentes entre seus aminoácidos (revisado por NEGRÃO et al., 2011).

Respostas em longo prazo incluem o ajuste osmótico, exclusão de Na^+ e homeostase de K^+ e regulação de antioxidantes. No ajuste osmótico, para evitar danos de desidratação, desnaturação de proteínas e desestabilização de estruturas celulares, metabólitos não tóxicos, conhecidos como solutos compatíveis, se acumulam no citoplasma para ajustar o potencial osmótico entre o citosol e o

apoplasto. Esses compostos compreendem açúcares, álcool, aminoácidos e derivados, sendo no arroz a prolina o soluto mais comum nessa condição. A exclusão de Na⁺ pode ocorrer na planta inteira ou compartimentalização intracelular. Na planta inteira, há absorção seletiva pelas células da raiz, carregamento do xilema com K⁺ ao invés de Na⁺, e retenção de Na⁺ na parte superior do sistema radicular e na parte inferior da parte aérea pela troca de K⁺ por Na⁺. Na compartimentalização intracelular o Na⁺ é enviado para o vacúolo.

O estresse salino promove a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos oxidativos em diferentes estruturas celulares. Assim, na regulação de metabólitos antioxidantes ocorre a produção de ácido ascórbico e glutathione reduzida, além de enzimas do sistema antioxidante como superóxido dismutases, catalases, ascorbato peroxidases, glutathione S-transferases e glutathione peroxidases, que promovem um balanço entre a formação e remoção de EROs e a produção de H₂O₂ para sinalização celular (revisado por NEGRÃO et al., 2011).

A elucidação dos mecanismos de resposta ao estresse é fundamental para auxiliar os melhoristas no desenvolvimento de cultivares de arroz tolerantes a salinidade. No entanto, sabe-se que esses mecanismos são controlados por um grande número de genes, regulados de forma complexa, envolvendo a sinalização hormonal e de outras moléculas, como EROs e Ca. Inúmeros estudos têm identificado genes chave, associados à tolerância a salinidade, porém, por se tratar de um caráter complexo, e que se manifesta em diferentes níveis de acordo com o estágio de desenvolvimento, a base molecular da tolerância à salinidade não foi completamente elucidada.

O avanço da biotecnologia tem auxiliado a desvendar os mecanismos associados a caracteres quantitativos em plantas, como a tolerância a estresses abióticos. Dentre essas ferramentas pode-se citar o estudo de associação genômica ampla (GWAS – do inglês *Genome Wide Association Studies*), também conhecido como mapeamento associativo ou mapeamento de desequilíbrio de ligação. Com a utilização de populações naturais e marcadores moleculares, essa ferramenta possibilita a identificação de nucleotídeos de caracteres quantitativos (QTNs) subjacentes a locos de caracteres quantitativos (QTLs). Assim, após o mapeamento de QTNs associados à salinidade, a região pode ser dissecada a fim de identificar e caracterizar os genes responsáveis pela tolerância à salinidade.

Com base nessa contextualização teórica, esse estudo teve como objetivo a identificação de regiões genômicas associadas à resposta a salinidade em arroz. Para isso foi utilizado um painel composto por acessos de arroz cultivados no Brasil, no estágio de plântula, e uma plataforma de marcadores SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Aspectos genéticos e morfológicos da cultura do arroz

O gênero *Oryza* pertence à família Poaceae, subfamília Oryzoideae e tribo Oryzeae, classe monocotiledônea e divisão das Angiospermas (BOTELHO, 1914; SAARELA et al., 2018). Esse gênero é composto por 24 espécies e 10 genomas (GE et al., 1999; revisado por PEGORARO et al., 2018), sendo duas espécies cultivadas, *Oryza sativa* L., (arroz asiático) e *Oryza glaberrima* Steud. (arroz africano), domesticadas independentemente a partir de *Oryza rufipogon* na Ásia e *Oryza barthii* na África, respectivamente (revisado por WIN et al., 2016 e PEGORARO et al., 2018).

O arroz asiático e o arroz africano apresentam o mesmo número básico de 12 cromossomos ($x = 12$) e são diploides ($2n = 24$). Porém, a representatividade dos genomas difere, sendo AA e AgAg para *O. sativa* e *O. glaberrima*, respectivamente (MAGALHÃES; OLIVEIRA, 2008). Acredita-se que processos evolutivos, como duplicação cromossômica, foram presentes na tribo Oryzeae por esta apresentar número de cromossomos $x = 12$, enquanto que em gramíneas ancestrais o número básico é $x = 6$ (TERRES et al., 1998). O tamanho do genoma de *O. sativa* é aproximadamente de 390Mpb, e por possuir o genoma pequeno e de fácil manipulação, tem se tornado um modelo de pesquisa para outras gramíneas (DEVOS; GALE, 2000; IRGSP, 2005).

A descoberta dos centros de origem das culturas ocorre através da coleta de dados arqueológicos, históricos, geográficos e culturais e pela identificação e distribuição da diversidade genética no local. Para a espécie *O. sativa* é possível inferir que a origem foi próxima aos vales dos rios Yangtze e Mekong, localizados em países asiáticos. E alguns dos centros de diversidade apontados são o nordeste da Índia, norte de Mianmar e Tailândia, na encosta das montanhas do Himalaia, no Estado de Chhattisgarh, trato de Jeypore da Odisha, Província de Yunnan na China (SINGH; UPADHYAYA, 2016).

As plantas de *O. sativa* apresentam características singulares como folhas herbáceas, estreitas, com nervuras lineares, borda serrilhada e a última folha do colmo é identificada como folha bandeira. As raízes são classificadas como adventícias e fibrosas, e os colmos são ocos, sendo um o principal e os demais afilhos. As inflorescências são denominadas como panículas, compostas por pares de glumelas florais (pálea e a lema) estéreis que tem função de proteger a semente e que podem demonstrar um alongamento chamado de arista, servindo como uma estrutura de

dispersão da espécie. Esse conjunto é chamado de espiguetas, que são presas no pedicelo. Apresenta também ramificações secundárias na panícula e uma lígula com 10 milímetros de comprimento aproximadamente (PEREIRA, 2002; SOUZA et al., 2015; VAUGHAN et al., 2003). É considerada uma cultura anual ou perene, semi-aquática e tem uma elevada gama de adaptações a diferentes condições edafoclimáticas (HEMAMALINI et al., 2000; TERRA et al., 2013).

Os processos evolutivos e de domesticação do arroz sob atuação da seleção natural e artificial, levou a uma grande divergência genética na espécie, formando duas principais subespécies, *indica* e *japonica*. Alguns estudos dividem a espécie *O. sativa* em sete grupos, *indica*, *japonica temperada*, *japonica tropical*, *aus*, *aromatico*, *ashina* e *rayada* (GLASZMANN, 1987; WANG et al., 2014). Considerando as duas principais subespécies verifica-se que são diferenciadas por caracteres morfológicos, destacando a forma de grão, por apresentar uma diferença discrepante, um tipo referindo-se a longo e fino e o outro a curto e espesso, para as subespécies *indica* e *japonica*, respectivamente (CHANDRARATNA, 1964; WATANABE, 1997). Além dos caracteres agrônômicos distintos, existe uma diferença quanto às respostas a estresses abióticos e bióticos, como baixas temperaturas, genes associados à patogenicidade específica do fungo causador de brusone e outras moléstias, a germinação quando relacionadas ao vigor, habilidade competitiva quando submetidas a condições ambientais alteradas e o comportamento da planta quanto à aplicação de fertilizantes provocando ou não acamamento (MACKILL et al., 1996; OKA; MORISHIMA, 1997).

2.2 Importância econômica do arroz

Em média 30 espécies são cultivadas para o consumo humano, e dentre elas está o arroz, especialmente *O. sativa* L., o qual é uma das três principais gramíneas cultivadas, e corresponde a 70% da dieta humana em nível mundial (MAGALHÃES; OLIVEIRA, 2008). No continente asiático, países onde 90% desse cereal é cultivado, o consumo médio é alto, de 78kg pessoa ano⁻¹, enquanto que em países situados na América Latina o consumo médio fica em torno de 29 kg pessoa ano⁻¹, ressaltando o Brasil que é considerado um grande consumidor de arroz, com a média de 32 kg pessoa ano⁻¹ (SOSBAI, 2018).

O primeiro produtor mundial de arroz é a China, seguido pela Índia e Indonésia, com produções de 148,873 milhões de toneladas, 112,910 milhões de toneladas e 37,000 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil é o nono país em produção em escala mundial, com a produção de 11,3 milhões de toneladas, sendo o maior produtor das Américas e apontado como um produtor primordial entre os países ocidentais (USDA, 2018).

No Brasil, na safra 2017/2018 a produção total brasileira foi de 11,3 milhões de toneladas, a produtividade em torno de 6,1 toneladas por hectare e a área de cultivo cerca de 1,9 milhões de hectares. Da produção nacional, o estado do Rio Grande de Sul contribuiu com 8,4 milhões de toneladas na safra 2017/2018. É considerado o Estado mais produtivo dentre os Estados brasileiros, e o sistema de cultivo utilizado, o irrigado por inundação, apresenta a uma elevada contribuição na resposta do rendimento (CONAB, 2018).

A cultura do arroz exerce uma função estratégica quando se refere a questões de segurança alimentar, pois apresenta grande importância em aspectos socioeconômicos, como atuação na renda de populações de alto e baixo poder aquisitivo. Além disso, representa 20% das calorias que compõe a dieta humana de mais de três bilhões de pessoas, o que motiva a constante busca por alternativas eficazes para o incremento no rendimento (SOSBAI, 2018).

2.3 Efeito dos estresses abióticos no arroz

O desenvolvimento e a produtividade do arroz têm sido gravemente afetados por estresses abióticos como frio, seca, calor, submergência e salinidade (ZHANG et al., 2015). A intensificação dos estresses abióticos devido às mudanças climáticas em curso aliado à maior demanda de alimentos decorrente do constante crescimento populacional e a escassez de terras aráveis para expansão dos cultivos ameaça a segurança alimentar, gera uma demanda por cultivares de arroz mais produtivas e mais tolerantes às condições adversas (BITA; GERATS, 2013; HIRABAYASHI et al., 2013; WANG, 2005).

Um estresse abiótico é um evento complexo, que provoca danos em distintos estádios de desenvolvimento da planta, a qual responde através de diversos mecanismos e combinações destes para tolerar a condição adversa a qual está submetida. Essa complexidade torna o processo de melhoramento e a identificação

de genes de tolerância muito difícil, se tornando um grande desafio para os melhoristas de plantas (FLEURY et al., 2010; REYNOLDS; TUBEROSA, 2008; SALEKDEH et al., 2009). A resposta ao estresse é, na maioria das vezes, decorrente da expressão de um grande número de genes (HONG et al., 2016). Os produtos desses genes desencadeiam uma sequência de modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (LEI et al., 2013; SCAFARO et al., 2011). De acordo com o mecanismo de resposta, o estresse pode causar alterações na função e estrutura dos componentes da célula, prejudicando o processo fotossintético da planta, ocasionando distúrbios nas rotas metabólicas e mesmo morte no tecido vegetal (VIGHI, 2016). Dentre os estresses abióticos, a salinidade é uma ameaça progressiva para as lavouras de arroz, pois afeta negativamente a produtividade. Ainda, o desenvolvimento de genótipos tolerantes é um desafio para os melhoristas, uma vez que a tolerância à salinidade é controlada por muitos genes, que se expressam em distintos estádios da planta (FLEURY et al., 2010; MUNNS et al., 2008; WITCOMBE et al., 2008).

2.4 O problema da salinização

A salinização do solo ocorre em várias partes do mundo sendo uma situação cada vez mais difícil de controlar. Acredita-se que cerca de 1 bilhão de hectares apresentem índices elevados de sais, um problema que ocorre também em áreas sob cultivo irrigado, resultando numa diminuição da produção das culturas (FAO, 2015). Os solos que adquiriram o excesso de sal através das atividades do homem somam aproximadamente 76 milhões de hectares, desses, 57 milhões de hectares estão situadas na Ásia (OLDEMAN et al., 1991). Em 2006, verificou-se que dos 301 milhões de hectares de áreas sob cultivo irrigado, 60 milhões, ou seja, 20% da área total irrigada, apresentam salinidade no solo, dos quais 35 milhões de hectares estão localizados em quatro países, sendo Paquistão, Índia, China e Estados Unidos, com 3,2 milhões, 20 milhões, 7 milhões e 5,2 milhões de hectares, respectivamente (FAO, 2015; SQUIRES; GLENN, 2011).

Na América do Sul em torno de 129,3 milhões de hectares das áreas cultivadas apresentam excesso de sal (UNEP, 1992). Dentre as regiões brasileiras, o Nordeste é a porção de área que mais é prejudicada pela a salinidade, afetando 4 milhões de hectares do Brasil. Já na região Sul, no Rio Grande do Sul o aumento de sais no solo

ocorre devido à área de cultivo estar nas proximidades das planícies costeiras, atingindo cerca de 200 mil hectares. Na região Sul, com a diminuição do nível de água da Lagoa dos Patos e também pelo vento ocorre à entrada de água do mar, aumentando os níveis de sais em proporções que podem ser prejudiciais à cultura (CARMONA et al., 2011).

Solos afetados pela salinidade apresentam altas quantidades de sais solúveis como sódio (Na^+), magnésio (Mg^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), cloreto (Cl^-) e sulfato (SO_4^{2-}) (revisado por HUSSAIN et al., 2017). Os solos com excesso de sal podem ser classificados como solos sódicos, solos salinos-sódicos e solos salinos. Os solos sódicos possuem uma condutividade elétrica do extrato de saturação (CEes) inferior a 4 dS m^{-1} , com um pH em torno de 8,5 a 10 e com uma percentagem de troca de sódio trocável (PST) superior a 15%. Os solos salinos-sódicos possuem uma PST superior a 15%, condutividade elétrica superior a 4 dS m^{-1} e com um pH próximo 8,5. Os solos salinos apresentam um pH abaixo de 8,5, uma condutividade elétrica acima de 4 dS m^{-1} e PST é abaixo de 15% (DAKER, 1988).

As áreas que possuem elevados teores de sais variam de acordo com influência geográfica e com condições climáticas, a diversificação da paisagem, atividades agrícolas, tipo de método de irrigação utilizado e a política relacionada ao manejo da terra e da cultura. Com isso, a salinidade do solo surge a partir de causas naturais e fontes de sal ou pela contribuição da presença do homem que induz a salinização do solo (FAO, 2015).

Com relação às causas naturais, são determinadas e divididas pelo intemperismo das rochas, que é o processo onde os sais percolam para os horizontes inferiores ou por escoamento superficial. No primeiro caso os sais são levados para camadas mais distantes, acumulando sais nos solos posterior a evaporação da água, e no segundo caso ocorre o acréscimo de concentração desses sais em rios, lagos, açudes e lagoas (AYERS; WESTCOT, 1991). Além disso, contribui para a salinidade o uso da água do mar para a inundação das lavouras nas regiões costeiras e também quando utilizado a irrigação pelo lençol freático próximo a superfície, em locais com baixa pluviosidade (OLIVEIRA et al., 2010). E por fim, através da deposição atmosférica pelas chuvas ou precipitações secas, sendo considerada a principal fonte de sal em grandes porções de áreas (FAO, 2015).

Entre as causas de salinização induzidas pelo homem estão a instalação de um sistema de drenagem deficiente que resulta na subida do lençol freático, e a irrigação com a água subterrânea salobra, sendo estas a salinização primária e salinização secundária, respectivamente. Também favorecem a salinidade do solo a má condução da água em lavouras, tratos culturais conduzidos erroneamente em áreas inundadas, banhos de água em períodos prolongados e frequentes e a ocorrência de invasão de águas oceânicas por meio de zonas localizadas nas costas (FAO, 2015).

2.5 Estresse salino

O excesso de sal induz cascatas de sinalização, causando distúrbios de grande impacto nas rotas metabólicas das plantas, prejudicando o crescimento, desenvolvimento e rendimento da cultura. Os efeitos iniciais provocados pelo estresse salino são modificações no potencial osmótico da planta, reduzindo o transporte da água, induzindo o estresse hídrico e conseqüentemente limitando o crescimento da planta, caracterizando o componente osmótico ou estresse osmótico (Figura 1). O excesso de íons situado nas paredes e tecidos vegetais pode ocasionar desequilíbrio nutricional, toxicidade iônica, ou os dois, resultando em falhas nos processos moleculares e metabólicos, suspendendo o desenvolvimento vegetal e causando a morte generalizada das células, caracterizando o componente iônico ou estresse iônico (Figura 1) (KUMAR et al., 2009; ZHU, 2001).

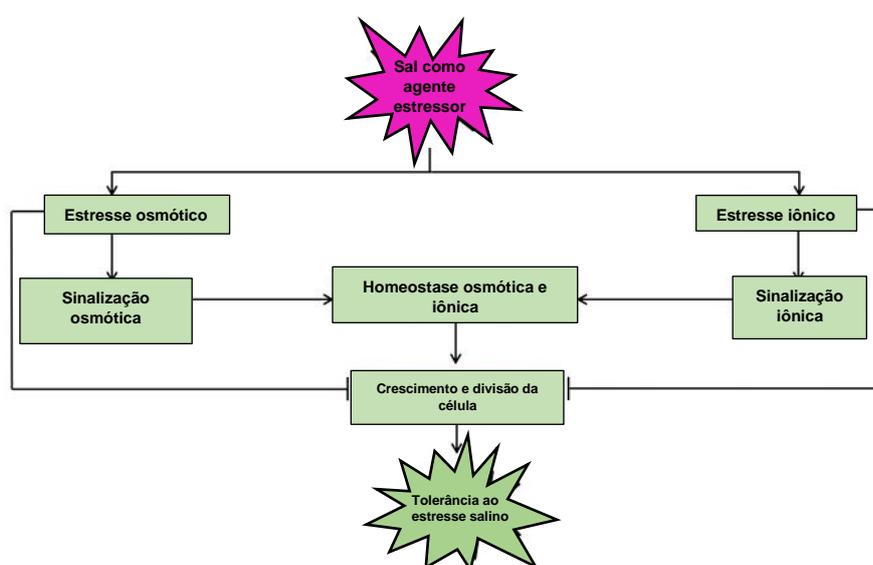


Figura 1. Mecanismos de resposta das plantas ao estresse salino.

Fonte: Kumar et al., 2013.

A resposta ao estresse vai depender do tipo de planta, sensível à salinidade do solo ou tolerante a elevadas concentrações de sal, definidas como glicófitas e halófitas, respectivamente (TUTEJA et al., 2011). O arroz apresenta inúmeras respostas quando submetido ao estresse salino, demonstrando alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, específicas. Pode ocorrer resposta em apenas algumas células ou sinergicamente na planta inteira (REDDY et al., 2017). Ainda, a resposta da planta ao excesso de sal pode ter efeito imediato ou demorar alguns dias ou até semanas (ROY et al., 2014).

A resposta morfológica da planta depende do estágio de desenvolvimento, sendo as fases de plântula e florescimento as mais prejudicadas para as lavouras orizícolas. Após um período prolongado sob o estresse salino surgem danos como indução da senescência prematura em folhas mais velhas, diminuição da parte aérea, clorose, redução do número de afilhos férteis, encerramento do perfilhamento e elevação da esterilidade das espiguetas, que influencia negativamente os processos de polinização e fecundação, resultando em redução da produtividade (CARMONA et al., 2011; DANIELOWSKI, 2013).

A resposta fisiológica é iniciada pelas mudanças do potencial osmótico, devido ao excesso de sais solúveis acumulados na planta, resultando numa redução do gradiente de potencial de água entre solo e planta. Portanto, uma porção menor de água é utilizada para o crescimento da planta, causando um déficit hídrico ou também chamada de seca fisiológica. Durante o estresse osmótico ocasionado pela salinidade, ocorre o fechamento dos estômatos para reduzir a perda de água por transpiração. Essa mudança fisiológica, controlada pelo acúmulo de ABA e também pelas espécies reativas de oxigênio (SHI et al., 2012; YOU et al., 2013), impede a captação de CO₂. Dessa forma, a salinidade pode limitar a fotossíntese devido à redução intracelular de CO₂, inibição da síntese de clorofila, do transporte de elétrons, da habilidade de absorver a energia excessiva da fluorescência da clorofila, da eficiência da RUBISCO e fotofosforilação (revisado por LIU et al., 2011). Essas mudanças fisiológicas levarão a perda de produtividade da cultura.

2.6 Sinalização celular sob estresse salino

A sinalização que ocorre em uma planta em condição de estresse salino é decorrente da atuação de fitohormônios, como auxinas, etileno, brassinosteróides, citocininas, giberelinas e ácido abscísico (ABA), responsáveis pela ativação do mecanismo de defesa da planta. Nessa condição ocorre a diminuição da atividade das giberelinas e citocininas, que são promotores de crescimento, e também regula a abertura de estômatos, no caso das citocininas. Por outro lado, o ABA, conhecido como inibidor de crescimento e responsável pelo fechamento dos estômatos, apresenta um acréscimo na atividade. Essas mudanças estão relacionadas com a inibição da fotossíntese, redução do crescimento da planta e um acréscimo na senescência foliar das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2011). Para as auxinas, também consideradas fitohormônio de crescimento, a alteração do acúmulo e redistribuição decorrente do estresse promove a hipersensibilidade da planta a salinidade, causando redução no crescimento e desenvolvimento (RYU; CHO, 2015). Tem sido demonstrado que os brassinosteróides atuam positivamente na mitigação dos efeitos nocivos do estresse por excesso de sal na produção de diversas culturas (CLOUSE; SASSE, 1998; IKEKAWA; ZHAO, 1991). Por fim, quando em condição de estresse salino, o etileno ativa um complexo de sinalização que inclui fatores de transcrição, receptores de membrana, componentes do citoplasma, e catabolismo da poliamina e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (FREITAS, 2015).

No estresse salino via componente osmótico, várias moléculas são sintetizadas para que ocorra a sinalização, como as proteínas quinases transmembranares, dois componentes histidinas quinases e as quinases associadas à parede (TÜRKAN; DeMIRAL, 2009). O lado de fora da célula que sob condições de estresse está hiperosmótico, influencia a perda de turgescência das células localizadas na raiz, induzindo modificações na membrana plasmática e ativando a auto-fosforilação no resíduo de histidina do domínio da proteína receptora histidina quinase da membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* (AtHK1), caracterizada como osmo-sensor. O grupo fosfato é transferido para um resíduo de aspartato, que está situado no domínio regulador de resposta, que vai atuar na transdução de sinal (Figura 2A). O estresse osmótico também pode ser percebido nas células da raiz devido ao efeito mecânico ocasionado pelo excesso de sal, modulando os canais iônicos da membrana plasmática. A perda de volume celular, favorece a captação de íons nos canais iônicos, que são osmosensores, promovendo uma despolarização da membrana e

consequentemente um acréscimo na concentração de cálcio no citoplasma (Ca^{2+}) levando a transdução de sinal (Figura 2B) (revisado por PRISCO et al., 2016).

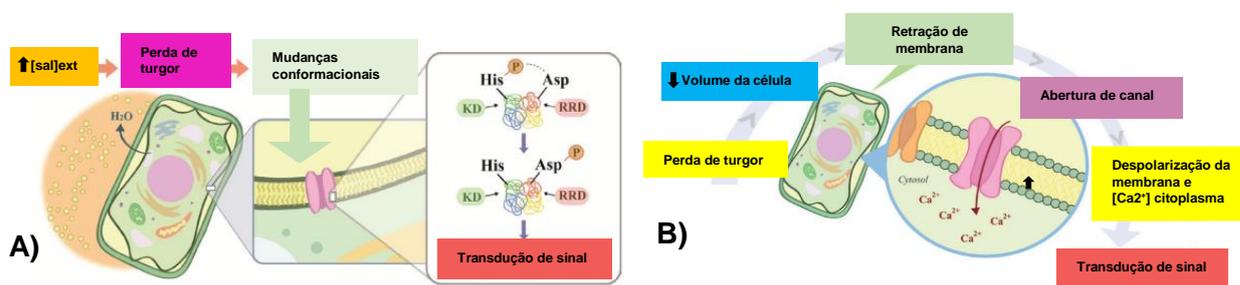


Figura 2. Mecanismos de percepção do componente osmótico do estresse salino pelas plantas.
A - Percepção do componente osmótico do estresse salino por AtHK1 (Histidina quinase de *Arabidopsis thaliana*) presente no plasmalema e ativação do processo de transdução de sinal. **B** – Percepção do componente osmótico do estresse salino por canais iônicos e ativação do processo de transdução de sinal.

Fonte: Prisco et al., 2016.

Esta sinalização via Ca^{2+} está diretamente ligada à expressão de genes codificadores de proteínas situadas na membrana, destacando-se a aquaporina, que tem como função aprimorar a eficiência de absorção da água pelas células, auxiliando na regulação osmótica do citoplasma e contribuindo para a biossíntese de osmólitos. Estudos indicam que o hormônio ABA também atua como um sinalizador celular. Esse hormônio regula uma família de proteínas chamadas *Pyrabactin Resistance1 (PYR1) / Pyrabactin-likes (PYLs) / Regulatory Components of ABA Receptors (RCARs)*, também denominada de família PYRs, que atuam como receptoras de ABA (QIN et al., 2011).

Alguns genes que codificam proteínas envolvidas no mecanismo de resposta ao estresse salino apresentam regulação dependente do hormônio ABA, enquanto outros genes são regulados em vias independentes do ABA (Figura 3). Assim, fatores de transcrição (FT) ativados de modo dependente ou independente do ABA interagem com regiões promotoras específicas dos genes funcionais, regulando a sua expressão. No complexo de regulação ABA dependente a principal cascata de sinalização depende dos FTs zíper de leucina básico (bZIP), envolvendo os receptores PYR1, PYLs, RCARs, fosfatases PP2C e proteínas quinases SnRK2 (revisado por PRISCO et al., 2016; SHINOZAKI et al., 2015;). O fator de transcrição bZIP se liga no elemento *cis* ABRE (elementos responsivos aos ABA) presente na região promotora de genes funcionais (KUMAR et al., 2013).

Na regulação ABA independente ocorre a sinalização de fatores de transcrição responsivos a desidratação (DREB2) com a participação da sinalização de MAP quinases. Os FTs DREB se ligam ao elemento *cis* DRE (elemento responsivo a desidratação) / CRT (repetição C) presente na região promotora de genes funcionais (KUMAR et al., 2013). Alguns genes funcionais, apresentam em seus promotores ambos elementos *cis* ABRE e DRE, sendo regulados pelas duas vias, ABA dependente e ABA independente (revisado por PRISCO et al., 2016).

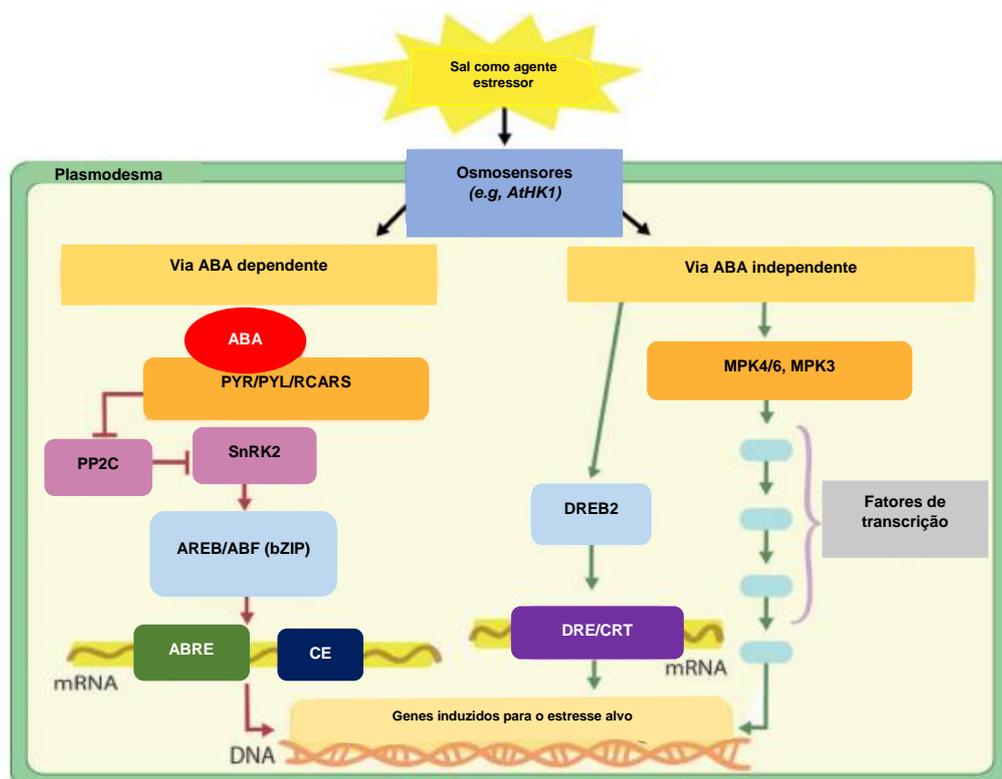


Figura 3. Sinalização ABA dependente e ABA independente.

Fonte: Prisco et al., 2016.

Pelo componente iônico do estresse salino (rota SOS – sensível ao sal excessivo), o íon Na^+ é identificado tanto no meio extracelular como o meio intracelular, através do receptor da membrana plasmática, e por proteínas de membrana e enzimas sensíveis, respectivamente. Quando ocorre o estresse, que eleva a concentração de Na^+ beneficia a absorção de cátions nas células localizadas na raiz, assim como o íon Na^+ pode se locomover transversalmente por canais e transportadores. Esse acúmulo de Na^+ resulta numa drástica despolarização da membrana plasmática e no tonoplasto, formando um efluxo de K^+ imediato pelos canais específicos de K^+ para regular a despolarização. Além disso, outro fator

relevante é o acréscimo da concentração de Ca^{2+} no citoplasma, que é determinado como um sinalizador secundário (revisado por PRISCO et al., 2016) (Figura 4).

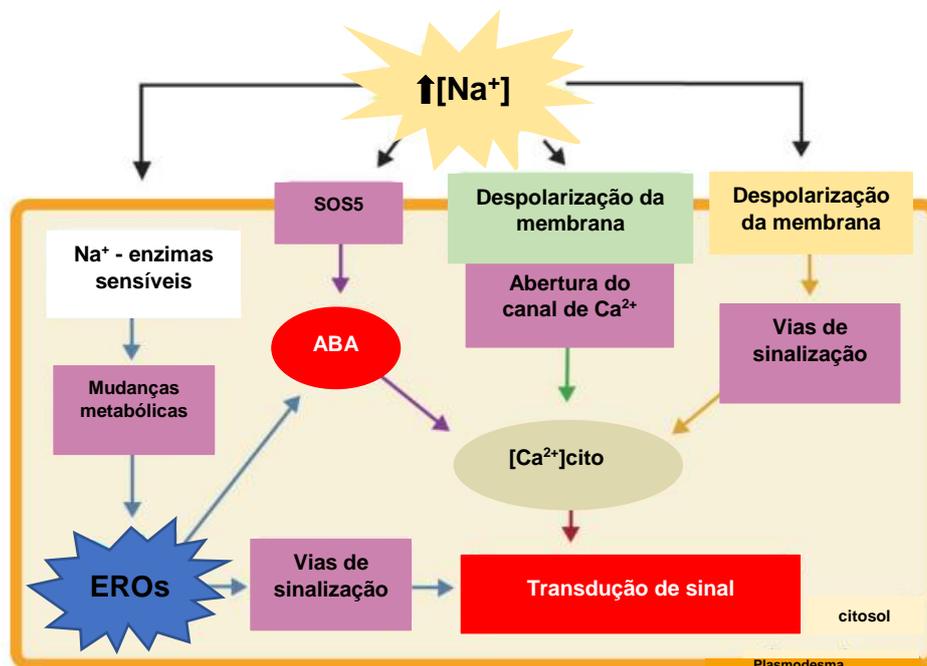


Figura 4. Mecanismo de percepção do componente iônico do estresse salino pelas plantas.

Fonte: Prisco et al., 2016.

2.7 Outras mudanças metabólicas sob condição de estresse salino

Alterações na fotossíntese são percebidas quando ocorre o estresse, ocasionando a diminuição das moléculas de NADPH através do ciclo de Calvin, e a diminuição da regeneração e disponibilidade das moléculas de NADP^+ nas reações fotoquímicas. Com isso ocorre excesso de excitação de energia nos tilacóides, principalmente nas membranas, que diminui o acúmulo dos componentes da cadeia de transporte de elétrons e induz a produção de inúmeros EROs (espécies de reativas de oxigênio). No fotossistema II ocorre o vazamento de elétrons para o oxigênio molecular (O_2), pela oxidação da quinona A e B, formando o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Nas membranas dos tilacóides o $\text{O}_2^{\cdot-}$ produzido pode ser reduzido para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos elementos da plasto-hidroquinona e componentes do fotossistema I ou pode ser dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 5A) (GURURANI et al., 2015). H_2O_2 é convertido a H_2O pela catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX) e ascorbato peroxidase (APX). A reação de Haber-Weiss gera $\cdot\text{OH}$ (radical hidroxila) a partir de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$, para isso, inicialmente o Fe^{3+} é reduzido por $\text{O}_2^{\cdot-}$, seguido pela oxidação por H_2O_2 (reação de Fenton). A transferência

de energia para O_2 leva a formação de oxigênio singlete (1O_2) (SHARMA et al., 2012). A produção de EROs ocorre também na mitocôndria devido ao vazamento de elétrons e em diferentes compartimentos celulares (Figura 5B).

As espécies reativas de oxigênio produzidas em excesso, quando a planta está em condição de estresse abiótico, causam danos na integridade da membrana das células, prejudica os cloroplastos e interrompe as rotas fotoquímicas e a fotossíntese. Essas EROs influenciam a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (APEL; HIRT, 2004; CHEN et al., 2011), sendo o radical hidroxila a espécie reativa mais tóxica (MIGNOLET-SPRUYT et al., 2016). A produção de antioxidantes, de natureza enzimática e não enzimática, constitui o mecanismo de proteção da planta, controlando as EROs e neutralizando seus efeitos deletérios, que provocam estresse oxidativo (AZEVEDO-NETO et al., 2008; SCANDALIOS, 2002).

Tem sido demonstrado recentemente que as EROs também atuam na sinalização de resposta a estresse pelas plantas. A sinalização implica na manutenção das EROs em níveis não tóxicos, garantindo um delicado balanceamento entre a produção e eliminação dessas moléculas (YOU; CHAN, 2015).

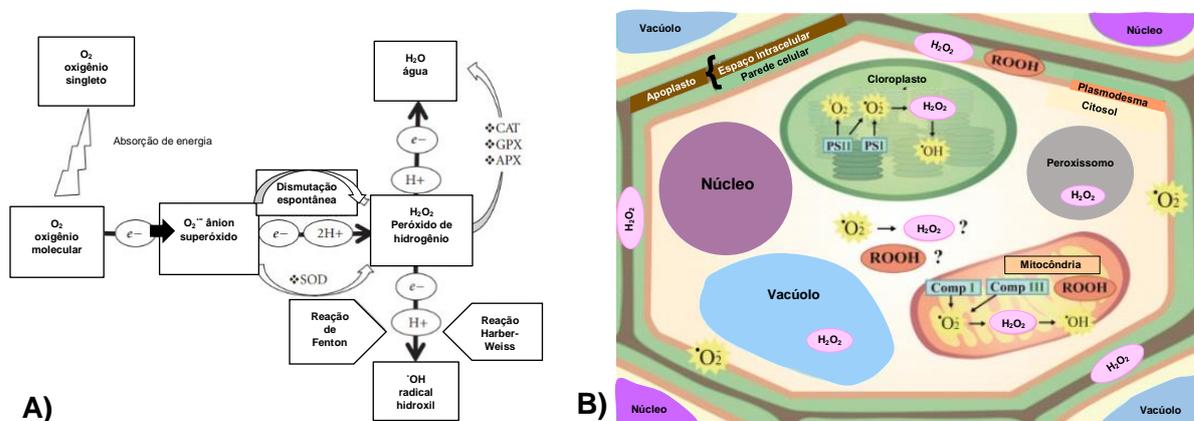


Figura 5. Síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs). **A** – Síntese de diferentes moléculas EROs. **B** – Diferentes locais de síntese de EROs nas células.

Fonte: Sharma et al., 2012; Prisco et al., 2016.

Outra resposta da planta em resposta ao estresse salino é a síntese e acúmulo de solutos orgânicos, conhecidos como osmoprotetores ou solutos compatíveis, como a prolina, glicina betaína, colina, o-sulfato, açúcares e polióis. Dentre os solutos compatíveis, a prolina é um aminoácido de baixo peso molecular, que diminui os

efeitos negativos das EROs, estabilizando o sistema antioxidante através de ajustes osmóticos, protegendo a integridade das membranas celulares. Há evidência que a prolina atua na regulação de genes relacionados à tolerância a salinidade (revisado por PER et al., 2017).

Outro soluto compatível também considerado osmoprotetor é a trealose, denominado como um dissacarídeo não redutor de glicose e apresenta uma função fisiológica de proteção das estruturas biológicas de prejuízos no decorrer da dessecação, e atua na estabilização de enzimas desidratadas, proteínas e membranas lipídicas (CROWE et al., 1992; HARE et al., 1998; YANCEY et al., 1982).

2.8 Mecanismos de tolerância e que evitam a salinidade

As plantas apresentam diferentes mecanismos de tolerância e que evitam a salinidade, como maior velocidade de emergência das plantas, restrição inicial da entrada de sais nas raízes, compartimentalização e metabolismo do nitrogênio (REDDY et al., 2017). O vigor do crescimento evita os efeitos de toxidez da salinidade, pois a concentração de Na^+ transportado em genótipos de crescimento rápido será menor do que em genótipos de crescimento lento (KUMAR et al., 2013; YEO et al., 1990).

No mecanismo de restrição inicial da entrada de sal ocorre absorção seletiva pelas células das raízes e entrada de íons juntamente com água nas vias simplástica e apoplástica. No arroz, as barreiras endodérmicas altamente suberizadas fornecem maior resistência ao fluxo de água. Nessa espécie, a maior quantidade de sódio é transportada para parte aérea pela via apoplástica. Na via apoplástica, a água entra pelas raízes, se movimenta célula a célula através de regiões intracelulares, atravessando o córtex e depositando o sal no xilema. As estrias de Caspary e a lamela suberizada restringem e forçam a água e o sal a cruzarem a membrana para o citoplasma, onde podem continuar na via simplástica, levando a diminuição de Na^+ na parte aérea. Na via simplástica, o Na^+ é captado pelos canais iônicos ou proteínas transportadoras da membrana plasmática, e os íons passam para o citoplasma, e se movimentam célula a célula através dos plasmodesmas para passar pelas estrias de Caspary até a descarga no xilema (revisado por REDDY et al., 2017). Ainda nesse mecanismo, verificou-se que o aumento do número de células da coifa da raiz pode

estar relacionado com a exclusão de Na^+ e a não entrada desse sal nas raízes (FERDOSE et al., 2009).

No mecanismo de compartimentalização ocorre o transporte de íons tóxicos para folhas mais velhas e para a bainha das folhas, buscando preservar os tecidos meristemáticos em crescimento. O transporte contínuo de Na^+ e Cl^- leva as folhas à morte. A taxa de folhas novas tem que ser maior que a taxa de folhas velhas mortas, para possibilitar fotossíntese e a planta produzir flores e sementes. Assim, a habilidade do arroz em acumular sal em folhas velhas contribui para sobrevivência em condições de salinidade (SHABALA; MUNNS, 2012).

Os estudos desenvolvidos por Xu et al., (2016) sugerem que em condições de estresse salino ocorre um aumento do metabolismo nitrogênio, que é redirecionado para síntese de solutos compatíveis (aminoácidos como prolina). Esses solutos compatíveis atuam minimizando os efeitos negativos ocasionados pelo estresse. O maior efeito da salinidade no metabolismo de nitrogênio é verificado em folhas velhas, com maior acúmulo de sal (WANG et al., 2012).

2.9 Estratégias de Melhoramento para tolerância a salinidade

A identificação de genes envolvidos em rotas metabólicas associadas à tolerância à salinidade pode auxiliar os melhoristas de plantas no desenvolvimento de cultivares tolerantes. Tem sido demonstrado que a superexpressão de genes que codificam proteínas envolvidas em vias de transporte, que tem como função a eliminação da toxicidade de íons ou a compartimentalização do mesmo, e que promovem a síntese de osmólitos, auxiliam na tolerância ao estresse salino (APSE et al., 1999).

Embora alguns resultados promissores tenham sido obtidos, principalmente em ambiente protegido, deve-se destacar que a tolerância à salinidade é um caráter quantitativo, complexo, que depende da expressão de um conjunto de genes de forma coordenada e sincronizada. A maioria dos estudos prioriza modificar sistemas endógenos, como tonificar rotas de resposta ao estresse da planta, destacando-se os sensores, os elementos sinalizadores e genes funcionais. Dessa forma, as abordagens aplicadas em laboratório, que utilizam a inserção de apenas um gene, resultam em uma melhora na tolerância, porém como a tolerância ao estresse salino é de natureza multigênica, estas estratégias se afastam do desenvolvimento de uma

planta tolerante ideal, especialmente em um horizonte de poucos anos (AGARWAL et al., 2013; CABELLO et al., 2014).

A complexidade da tolerância à salinidade (FLEURY et al., 2010; MUNNS et al., 2008; WITCOMBE et al., 2008) torna o processo de melhoramento muito difícil. Nesse sentido, o estudo da base genética que controla a tolerância é uma estratégia promissora para auxiliar os melhoristas de plantas. Dentre as abordagens para estudo da base genética está o mapeamento genético, que possibilita a identificação dos locos que controlam a característica de interesse, no caso a tolerância à salinidade (ROY et al., 2011).

Para estudo da base genética da tolerância à salinidade pode-se utilizar o mapeamento de ligação e/ou mapeamento associativo (mapeamento de desequilíbrio de ligação). A partir do conhecimento da base genética e identificação de genes associados à tolerância à salinidade, pode-se utilizar ferramentas biotecnológicas como transgenia, edição gênica e marcadores moleculares, para potencializar o processo de melhoramento.

No mapeamento genético é feita uma análise para determinar se um ou mais marcadores moleculares estão ligados a locos genéticos que controlam características quantitativas (QTLs) ou também a locos que controlam características qualitativas, seguido da identificação dos genes associados (BHERING; CRUZ, 2008). Para que um mapa genético seja fidedigno é importante considerar alguns fatores como a especificidade dos marcadores utilizados e o tipo e o tamanho da população avaliada. Se as populações já contêm informações de características morfológicas, agrônômicas e qualidade industrial, o tamanho de até 200 indivíduos é satisfatório, no entanto, quando às populações não são conhecidas, o número de indivíduos avaliados deve ser em torno de 600 para obter mapas confiáveis (BHERING; CRUZ, 2008).

O mapeamento de ligação depende da recombinação genética durante a construção de populações de mapeamento, que é feita a partir do cruzamento de apenas dois genótipos (genitores) contrastantes para característica de interesse. Nessa abordagem há uma resolução de mapeamento relativamente baixa e um baixo número de alelos pode ser estudado (WEN et al., 2009).

O mapeamento de desequilíbrio de ligação ou mapeamento associativo, também conhecido como estudo de associação genômica ampla (do inglês, *Genome*

Wide Association Study - GWAS), possibilita a descoberta de variantes genéticas associados a caracteres quantitativos, com uma série de vantagens, porém também exigências. Requer um grande número de marcadores, para vários locos (CUI et al., 2015; LEE et al., 2003) para conseguir identificar genes associados ao caráter de interesse. Para evitar a presença de associações espúrias é necessário, além de uma alta densidade de marcadores moleculares, uma população também de tamanho elevado, com repetições sob distintas condições ambientais (WEN et al., 2009). O mapeamento associativo depende dos eventos de recombinação genética histórica acumulada durante muitas gerações, já que utiliza uma população formada por diferentes genótipos que apresentam pouco vínculo e com alta variabilidade. Nesse caso há alta resolução de mapeamento e um grande número de alelos podem ser detectados, apresentando maior variabilidade quando comparada aos mapas genéticos de ligação e garantindo maior eficiência para estudos de caracteres de herança complexa (WEN et al., 2009; YU; BUCKLER, 2006).

Com base nas considerações apresentadas, o mapeamento associativo pode ser mais vantajoso que o mapeamento por ligação, por incluir a vasta variabilidade genética disponível nas populações de origem. No mapeamento associativo, através dos dados de um banco de germoplasma é possível trabalhar com toda a série alélica e não somente com dois alelos, como nos mapas genéticos. Além disso, não há obrigatoriedade de formação de populações segregantes, e os dados fenotípicos e moleculares de um banco de dados disponíveis em outros trabalhos podem ser utilizados no mapeamento associativo (YU; BUCKLER, 2006). Ainda, pode-se citar uma diminuição do tempo de pesquisa necessário para o desenvolvimento de estudos deste tipo (WEN et al., 2009).

Em ambas as estratégias, mapeamento genético e mapeamento associativo, é necessária a utilização de marcadores moleculares. Dentre os marcadores disponíveis, os SNPs (nucleotídeo de polimorfismo único) apresentam diversas vantagens, como a alta densidade e distribuição nos genomas, permitindo a localização de regiões do genoma associadas a características quantitativas como a tolerância ao excesso de sal (HAN; HUANG, 2013; WEI et al., 2018; YANG et al., 2014).

Diferentes estudos de mapeamento para tolerância à salinidade têm sido desenvolvidos. Em trabalhos utilizando GWAS multi-loco em 478 acessos de arroz,

verificou-se 66 genes próximos a 56 nucleotídeos de característica quantitativa (QTNs) conhecidos e identificaram dentre eles dois genes (*LOC_Os01g45760* e *LOC_Os10g04860*) associados a rota da biossíntese das auxinas (CUI et al., 2018). Para o estágio de germinação foram identificados 17 genes candidatos associados à tolerância à salinidade com base em 295 acessos (YU et al., 2018). Através dos índices de suscetibilidade ao estresse, índice de vigor e tempo médio de germinação, foram detectados 22 SNPs relacionados à tolerância ao estresse salino utilizando também 478 acessos de arroz (SHI et al., 2017). Ainda em estudos para germinação e plântula de arroz, 20 nucleotídeos de característica quantitativa foram identificados quanto à tolerância ao acúmulo de sal, em germoplasmas de continentes distintos, como Ásia, África e América Latina, tomando-se por base 219 acessos (NAVEED et al., 2018). Para o estágio de plântula, foram encontrados 93 genes candidatos relacionados à tolerância ao excesso de sal, estudando-se outros 295 acessos (YU et al., 2017). Além disso, para trabalhos no estágio reprodutivo, 64 SNPs foram identificados para características relacionadas à tolerância ao estresse salino, principalmente a relação Na^+/K^+ em 220 genótipos de arroz (KUMAR et al., 2015). Desse modo, baseado nos resultados apresentados, verifica-se que o mapeamento associativo representa um método eficiente para os estudos associados à tolerância ao estresse salino em arroz. No entanto, devido a esta abordagem não ter sido ainda conduzida utilizando acessos de arroz do Brasil, justifica-se a necessidade de aplicar e desenvolver essa ferramenta sobre o germoplasma brasileiro.

2.10 Referências Bibliográficas:

- AGARWAL, P. K.; SHEEL, P.; GUPTA, K.; JHA, B. Bioengineering for salinity tolerance in plants: State of the art. **Molecular Biotechnology**, v. 54, p. 102-123, 2013.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- APSE, M. P.; AHARON, G. S.; SNEDDEN, W. A.; BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in Arabidopsis. **Science**, v. 285, p. 1256-1258, 1999.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande, PB: UFPB, 1991, 218p.

- AZEVEDO, A. D. N.; GOMES, E. F.; PRISCO, J. T. Salinity and oxidative stress. In: Khan, N. A.; Singh, S. (ed.) **Abiotic stress and plant responses**. Cap.4, p. 57-82, 2008.
- BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Tamanho de população ideal para mapeamento genético em famílias de irmãos completos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 3, p. 379-385, 2008.
- BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-18, 2013.
- BOTELHO, C. **O arroz**. São Paulo: Typografia Levi, 1914, 525 p.
- CABELLO, J. V.; LODEYRO A. F.; ZURBRIGGEN, M. D. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 62-70, 2014.
- CARMONA, F. C.; ANGHINONI, I.; WEBER, E. J. Salinidade da água e do solo e seus efeitos sobre o arroz irrigado no Rio Grande do Sul. **Instituto Rio Grandense do Arroz**, Boletim técnico nº 10, 2011.
- CHANDRARATNA, M. F. **Genetics and Breeding rice**. London: Longmans, 1964, 389 p.
- CHEN, J.; HUANG, B.; LI, Y.; DU, H.; GU, Y.; LIU, H.; ZHANG, J.; HUANG, Y. Synergistic influence of sucrose and abscisic acid on the genes involved in starch synthesis in maize endosperm. **Carbohydrate**, v. 346, p. 1684-1691, 2011.
- CLOUSE, S. D.; SASSE, J. M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 427-451, 1998.
- CROWE, J. H.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. W. Anhydrobiosis. **Annual Review Physiology**, v. 54, p. 579-599, 1992.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produção de Arroz**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 21 de dezembro de 2018.
- CUI, Y.; ZHANG, F.; XU, J.; LI, Z.; XU, S. Mapping quantitative trait loci in selected breeding populations: A segregation distortion approach. **Heredity**, v. 115, p. 538-546, 2015.
- CUI, Y., ZHANG, F., ZHOU, Y. The Application of Multi-Locus GWAS for the Detection of Salt-Tolerance Loci in Rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1464, p. 1-9, 2018.

DANIELOWSKI, R. **Estresse salino em genótipos de arroz: Correlação entre dois sistemas de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

DAKER, A. **A água na agricultura**; manual de hidráulica agrícola. 7.ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1988, 543p.

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

FAO. **Status of the World's Soil Resources**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation. Chapter 6: Global soil status, processes and trends, 2015, 167 p.

FERDOSE, J.; KAWASAKI, M.; TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Differential sensitivity of rice cultivars to salinity and its relation to ion accumulation and root tip structure. **Plant Production Science**, v. 12, n. 4, p. 453-461, 2009.

FLEURY, D., JEFFERIES, S.; KUCHEL, H.; LANGRIDGE, P. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 12, p. 3211-3222, 2010.

FREITAS, V. S. **Metabolismo das poliaminas e do etileno e indução do sistema de defesa antioxidativa em genótipos de milho com tolerância diferencial ao estresse salino**. 2015, 137 p. Tese de doutorado – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

GARG, A. K.; JU-KON, K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WUN, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Annual Review of Physiology**, v. 54, n. 25, p. 15898-15903, 2002.

GE, S.; OLIVEIRA, G. C. X.; SCHAAL, B. A.; GAO, L. Z.; HONG, D. Y. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. **Heredity**, v. 82, p. 638-644, 1999.

GLASZMANN, J. C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 74, p. 1-30, 1987.

GODDIJN, J. O., VAN DUN, K. Trehalose metabolism in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 8, p. 315-319, 1999.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; TRAN, L. S. P. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. **Molecular Plant**, v. 8, p. 1304-1320, 2015.

HAN, B.; HUANG, X. Sequencing-based genome-wide association study in rice. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 2, p. 133-138, 2013.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the Roles of Osmolyte Accumulation during Stress. **Plant Cell & environment**, v. 21, p. 535-553, 1998.

HEMAMALINI, G. S.; SHASHIDHAR, H. E.; HITTALMANI, S. Molecular marker assisted tagging of morphological and physiological traits under two contrasting moisture regimes at peak vegetative stage in rice (*Oryza sativa* L.) **Euphytica**, v. 112, p. 69-78, 2000.

HIRABAYASHI, Y.; MAHENDRAN, R.; KOIRALA, S.; KONOSHIMA, L.; YAMAZAKI, D.; WATANABE, S.; KIM, H.; KANAE, S. Global flood risk under climate change. **Nature Climate Change**, v. 3, p. 816-821, 2013.

HONG, Y.; ZHANG, H.; HUANG, L.; LI, D.; SONG, F. Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-19, 2016.

HUSSAIN, S.; ZHANG, J. H.; ZHONG, C.; ZHU, L. F.; CAO, X. C.; YU, S. M.; JAMES, A. B.; HU, J. J.; JIN, Q. Y. Effects of salt stress on rice growth, development characteristics, and the regulating ways: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 11, p. 2357-2374, 2017.

IKEKAWA, N.; ZHAO, Y. Application of 24-epibrassinolide in agriculture. **American Chemical Society**, p. 280-291, 1991.

IRGSP International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, p. 793-800, 2005.

KUMAR, K.; KUMAR, M.; KIM, S. R.; RYU, H.; CHO, Y. G. Insights into genomics of salt stress response in rice. **Rice**, v. 6, n. 27, p. 1-15, 2013.

KUMAR, V.; SHRIRAM, V.; NIKAM, T. D.; JAWALI, N.; SHITOLE, M. G. Antioxidant enzyme activities and protein profiling under salt stress in indica rice genotypes differing in salt tolerance. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 55, p. 379-394, 2009.

KUMAR, K.; SINHA, A. K. Overexpression of constitutively active mitogen activated protein kinase 6 enhances tolerance to salt stress in rice. **Rice**, v. 6, n. 25, p. 1-5, 2013.

KUMAR, V.; SINGH, A.; MITHRA, S. V.; KRISHNAMURTHY, S. K.; PARIDA, S. K.; JAIN, S.; TIWARI, K. K.; KUMAR, P.; RAO, A. R.; SHARMA, S. K.; KHURANA, J. P.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). **DNA Research**, v. 22, p. 133-145, 2015.

LEE, K. S.; CHOI, W. Y.; KO, J. C.; KIM, T. S.; GREGORIO, G. B. Salinity tolerance of japonica and indica rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. **Planta An International Journal of Plant Biology**, v. 216, p. 1043-1046, 2003.

LEI, D.; TAN, L.; LUI, F.; CHEN, L.; SUN, C. Identification of heat-sensitive QTL derived from common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). **Plant Science**, v. 201-202, p. 121-127, 2013.

LIU, Y.; DU, H.; WANG, K. Differential Photosynthetic Responses to Salinity Stress between Two Perennial Grass Species Contrasting in Salinity Tolerance. **Hortscience**, v. 46, n. 2, p. 311-316, 2011.

MACKILL, D. J.; COFFMAN, W. R.; GARRITY, D. P. Rainfed lowland rice improvement. Los Baños, Laguna. 242 p. 1996.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; COSTA DE OLIVEIRA, A. Arroz: Alimentando a humanidade há milênios. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1ª ed., Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 185-208, 2008.

MIGNOLET-SPRUYT, L.; XU, E.; IDÄNHEIMO, N.; HOEBERICHTS, F. A.; MÜHLENBOCK, P.; BROSCHE, M.; BREUSEGEM, F. V.; KANGASJÄRVI, J. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 13, p. 3831-3844, 2016.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 651-681, 2008.

NAVEED, S. A.; ZHANG, F.; ZHANG, J.; ZHENG, T. Q.; MENG, L. J.; PANG, Y. L.; XU, J. L.; LI, Z. K. Identification of QTN and candidate genes for Salinity Tolerance at the Germination and Seedling Stages in Rice by Genome-Wide Association Analyses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 6505, p. 1-11, 2018.

OLDEMAN, L. R.; HAKKELING, R. T. A.; SOMBROEK, W. G. **World map of the status of human-induced soil degradation**. Wageningen, Netherlands: International Soil Reference and Information Center (ISRIC), v. 2, 1991, 35 p.

OLIVEIRA, A. B.; FILHO, E. G.; FILHO, J. E. O problema da salinidade na agricultura e as adaptações das plantas ao estresse salino. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-16, 2010.

OKA, H. I.; MORISHIMA, H. Wild and cultivated rice. In: MATSUO, T. et al. (Ed) **Science of the Rice Plant: Genetics**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, v. 3, p. 88-111, 1997.

PEGORARO, C.; FARIAS, D. R.; COSTA DE OLIVEIRA, A. *Oryza glumaepatula* Steud. In: T. K. Mondal and R. J. Henry (eds.), **The Wild Oryza Genomes**, 2018.

PER, T. S.; KHAN, N. A.; REDDY, P. S.; MASOOD, A.; HASANUZZAMAN, M.; KHAN, M. I. R.; ANJUM, N. A. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 126-140, 2017.

PEREIRA, J. A. **Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história**. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2002, 226 p.

PRISCO, J. T.; FILHO, E. G.; MIRANDA, R. S. Physiology and biochemistry of plants growing under salt stress. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**, p. 163-180, 2016.

QIN, F.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. **Plant & Cell Physiology**, v. 52, p. 1569-1582, 2011.

REDDY, I. N. L.; KIM, B. K.; YOON, I, S.; KIM, K. H.; KWON, T. R. Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches. **Rice Science**, v. 24, n. 3, p. 123-144, 2017.

RENOLDS, M.; TUBEROSA, R. Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 171-179, 2008.

ROY, S. J.; TUCKER, E. J.; TESTER, M. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 3, p. 232-239, 2011.

ROY, S. J.; NEGRAO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 115-124, 2014.

RYU, H.; CHO Y. G. Plant hormones in salt stress tolerance. **Journal of Plant Biology**, v. 58, p. 147-155, 2015.

SAARELA, J. M.; BURKE, S.V.; WYSOCKI, W. P.; BARRETT, M. D.; CLARK, L. G.; CRAINE, J. M.; PETERSON, P. M.; SORENG, R. J.; VORONTSOVA, M. S.; DUVALL, M. R.; A 250 plastome phylogeny of the grass family (Poaceae): topological support under different data partitions. **Peer J.**, p. 1-71, 2018.

SALEKDEH, G. H.; REYNOLDS, M.; BENNETT, J.; BOYER, J. Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. **Trends in Plant Science**, v.14, p. 488-496, 2009.

SCAFARO, A. P.; VON CAEMMERER, S.; EVANS, J. R. Temperature response of mesophyll conductance in cultivated and wild *Oryza* species with contrasting mesophyll cell wall thickness. **Plant Cell & Environment**, v. 34, p. 1999-2008, 2011.

SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Science**, v. 27, p. 483-486, 2002.

SHABALA, S.; MUNNS, R. Salinity stress: Physiological constraints and adaptive mechanisms. **Plant Stress Physiology**. 2 ed. United Kingdom & USA: CAB International, p. 59-93, 2012.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, p. 1-26, 2012.

SHI, B.; NI, L.; ZHANG, A.; CAO, J.; ZHANG, H.; QIN, T.; TAN, M.; ZHANG, J.; JIANG, M. OsDMI3 Is a Novel Component of Abscisic Acid Signaling in the Induction of Antioxidant Defense in Leaves of Rice. **Molecular Plant**, v. 5, n. 6, p. 1359-1374, 2012.

SHI, Y.; GAO, L.; WU, Z.; ZHANG, X.; WANG, M.; ZHANG, C.; ZHANG, F.; ZHOU, Y.; LI, Z. Genome-wide association study of salt tolerance at the seed germination stage in rice. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 92, p. 1-11, 2017.

SHINOZAKI, K.; UEMURA, M.; BAILEY-SERRES, J.; BRAY, E. A.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (ed.) **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2. ed. Oxford: Wiley Black Well, 2015. 1264p.

SINGH, M. UPADHYAYA, H. **Genetic and Genomic Resources for Grain Cereals Improvement**, Academic Press, p. 384, 2016.

SOSBAI – **Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado**. Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil. Farroupilha: SOSBAI, 2018.

- SOUZA, J. M. O.; CARNEIRO, M. F. H., PAULELLI, A. C. C., GROTTTO, D.; MAGALHÕES JÚNIOR, A. M.; JÚNIOR, F. B.; BATISTA, B. L. Arsenic and rice: toxicity, metabolism, and food safety. **Química Nova**, v. 38, n.1, 2015.
- SQUIRES, V.R.; GLENN, E.P. **Salination, Desertification and Soil Erosion**. In The role of food, agriculture, forestry and fisheries in human nutrition. Australia, EOLSS, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 5 ed., 2011. 778p.
- TERRA, T. G. R.; LEAL, T. C. A. B.; BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. Tolerância de linhagens de arroz de terras altas à seca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n.2, p. 201-208, 2013.
- TERRES, A. L.; GALLI, J.; FAGUNDES, P. R. R.; MACHADO, M. O.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M. de; MARTINS, J. F.; NUNES, C. D. M.; FRANCO, D. F.; AZAMBUJA, I. H. V. **Arroz irrigado no Rio Grande do Sul: generalidades e cultivares**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1998, 58 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 14).
- TÜRKAN, I.; DEMIRAL, T. Recent developments in understanding salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 2-9, 2009.
- TUTEJA, N.; GILL, S. S.; TUTEJA, R. Omics and Plant Stress Tolerance. **Bentham Science**, p. 39-64, 2011.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Proceedings of the Ad-hoc Expert Group Meeting to Discuss Global Soil. **Databases and Appraisal of GLASOD/SOTER**. Nairobi: Fevereiro 24-28, 1992.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Publications rice**. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov>. Acesso em 21 de dezembro de 2018.
- VAUGHAN, D.A., MORISHIMA, H., and KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 6, p. 139-146, 2003.
- VIGHI, I. L. **Estresses abióticos em arroz: Respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas**. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, 2016.
- XU, J. W.; HUANG, X.; LAN, H. X.; ZHANG, H. S.; HUANG, J. Rearrangement of nitrogen metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. **Plant Signaling Behavior**, v. 11, n. 3, e1138194 1-5, 2016.

WANG, G. Agricultural drought in a future climate: Results from 15 global climate models participating in the IPCC 4th assessment. **Climate Dynamics**, v. 25, p. 739-753, 2005.

WANG, H.; ZHANG, M. S.; GUO, R.; SHI, D. C.; LIU, B.; LIN, X. Y.; YANG, C. W. Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism of old and young leaves in rice (*Oryza sativa* L.). **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 194, p. 1-11, 2012.

WANG, C. H.; ZHENG, X. M.; XU, Q.; YUAN, X. P.; HUANG, L.; ZHOU, H. F.; WEI, X. H., GE, S. Genetic diversity and classification of *Oryza sativa* with emphasis on Chinese rice germplasm. **Heredity**, v. 5, p. 489-496, 2014.

WATANABE, Y. Genomic constitution of genus *Oryza sativa*. In: MATSOU, T, et al. (Ed.) **Science of the Rice Plant: Genetics**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, v.3, p. 29-39, 1997.

WEI, J.; WANG, A.; LI, R.; QU, H.; JIA, Z. Metabolome-wide association studies for agronomic traits of rice. **Heredity**, v. 120, p. 342-355, 2018.

WEN, W.; MEI, H.; FENG, F.; YU, S.; HUANG, Z.; WU, J.; CHEN, L.; XU, X.; LUO, L. Population structure and association mapping on chromosome 7 using a diverse panel of chinese germplasm of rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, p. 459-470, 2009.

WIN, K.T.; YAMAGATA, Y.; DOI, K.; UYAMA, K.; NAGAI, Y.; TODA, Y.; KANI, T.; ASHIKARI, M.; YASUI, H.; YOSHIMURA, A. A single base change explains the independent origin of and selection for the non shattering gene in African rice domestication. **New Phytologist**, v. 213, p.1925-1935, 2016.

WITCOMBE, J. R. et al. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 363, p. 703-716, 2008.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HANF, S. C.; BOWLUS, R. Pharmacological Characterization of an Opioid Receptor in the Ciliate Tetrahymena, **Science**, v. 217, p. 1214-1222, 1982.

YANG, W.; GUO, Z.; HUANG, C.; DUAN, L.; CHEN, G.; JIANG, N.; FANG, W.; FENG, H.; XIE, W.; LIAN, X.; WANG, G.; LUO, Q.; ZHANG, Q.; LIU, Q.; XIONG, L. Combining high-throughput phenotyping and genome-wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. **Nature Communications**, v. 5, n. 5087, p. 1-9, 2014.

YEO, A. R.; YEO, M. E.; FLOWERS, S. A.; FLOWERS, T. J. Screening of rice (*Oryza sativa*) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and

their relationship to overall performance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, n. 3, p. 377-384, 1990.

YOU, J.; CHAN, Z. ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1092, 2015.

YOU, J.; ZONG, W.; LI, X.; NING, J.; HU, H.; LI, X.; XIAO, J.; XIONG, L. The SNAC1-targeted gene *OsSRO1c* modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 569-583, 2013.

YU, J.; BUCKLER, E. S. Genetic Association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, New York, v. 17, p. 155-160, 2006.

YU, J.; ZAO, W.; Q, H.; KIM, T. S.; PARQUE, Y, J. Genome - wide association study and gene set analysis for understanding candidate genes involved in salt tolerance at the rice seedling stage. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 292, n. 6, p. 1391-1403, 2017.

YU, J.; ZHAO, W., TONG, W.; HE, Q.; YOON, M. Y.; LI, F. P.; CHOI, B.; HEO, E. B.; KIM, K. W.; PARK, Y. J. A Genome-Wide Association Study Reveals Candidate Genes Related to Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) at the Germination Stage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3145, p. 1-17, 2018.

ZHANG, F.; LUO, X.; ZHOU, Y.; XIE, J.; Genome-wide identification of conserved microRNA and their response to drought stress in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 711-721, 2015.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001.

ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E. S.; YU, J. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. **The Plant Genome**, Manhattan, v. 1, n. 1, p. 5-20, 2008.

3 CAPÍTULO I - Variabilidade genética, desequilíbrio de ligação e estrutura da população em painel de arroz brasileiro

3.1 Introdução:

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas produzidas no mundo, alimentando mais de 2,7 bilhões de pessoas (MUTHAYYA et al., 2014). A espécie se caracteriza por possuir importância econômica em diversos países, inclusive sendo opção de renda para pequenos produtores, também apresentando funções sociais e culturais pela frequência com que o cereal é introduzido na dieta humana (WALTER et al., 2008). Além disso, é considerada planta modelo para pesquisas genômicas e moleculares em monocotiledôneas (MENQUER et al., 2017).

A orizicultura apresenta grande importância econômica, sendo um dos três principais cereais cultivados no mundo. A maior produção se localiza nos países asiáticos. O Brasil com a produção de 11,3 milhões de toneladas é o maior produtor da América Latina e está entre os dez países que mais cultivam arroz em nível mundial.

Dentre os Estados brasileiros, o Rio Grande do Sul é responsável por mais de 70% da produção nacional, tendo produzido 8,4 milhões de toneladas na safra 2017/2018. O sistema de cultivo predominante neste estado, caracterizado irrigação por inundação é relevante na contribuição na produtividade da cultura em ambas as subespécies *indica* e *japonica* cultivadas (CONAB, 2018). Salienta-se, no entanto, que a subespécie *indica* é mais cultivada devido a preferência do mercado e questões culturais referentes a consumo de grão longo e fino.

O contínuo crescimento populacional e conseqüente aumento na demanda de alimentos resultam na maior exigência sobre os recursos naturais e agricultura. A necessidade de elevar a produtividade da cultura com o uso de alternativas sustentáveis é essencial para os agricultores, o que torna o melhoramento genético vegetal uma estratégia promissora frente a este desafio constante (MENQUER et al., 2017). No entanto, o germoplasma elite de arroz do Sul do Brasil sofre com o estreitamento da base genética, sendo uma grande dificuldade para o avanço do melhoramento sustentável desse cereal (RAIMONDI et al., 2014).

Sabe-se que a grande maioria dos caracteres de interesse agrônômico são controlados pela expressão de inúmeros genes, os locos de características quantitativas (QTLs), e sofrem grande influência das condições ambientais. Como tais caracteres são de natureza complexa, o melhoramento convencional isoladamente é

muitas vezes pouco eficaz. Assim, mapeamento de QTLs, para a descoberta e, a partir daí utilização de marcadores moleculares para a seleção assistida é uma abordagem promissora por agilizar e aprimorar o procedimento (VENSKE et al., 2018), permitindo a aplicação de abordagens genômicas em programas de melhoramento. Podem ser aplicadas duas estratégias principais para estudos de mapeamento genético em plantas, o mapeamento de ligação e o mapeamento associativo ou de desequilíbrio ligação, ainda chamado de estudo de associação genômica ampla.

Mesmo que o mapeamento de ligação, tido como método clássico, forneça informações valiosas, apresenta limitações como de gerar resultados apenas de populações biparentais e não permitindo obter informação da variabilidade genética contida em numerosos recursos abundantes do germoplasma. Compreender a base genética das diversas variações naturais derivadas de ancestrais comuns é primordial para identificar locos que venham a contribuir no desenvolvimento de cultivares superiores, como, por exemplo, para maior tolerância a estresses abióticos e melhor nutrição para os seres humanos, entre outras características (CHEN et al., 2014).

Estudos de associação genômica ampla (acrônimo do inglês, *Genome Wide Association Studies* - GWAS) têm um grande potencial para identificar variações naturais importantes em locos associados a caracteres de interesse, assim como variações alélicas em genes candidatos relacionados a caracteres quantitativos e complexos, incluindo aqueles associados ao crescimento, desenvolvimento, tolerância ao estresse e qualidade nutricional (KUMAR et al., 2015). GWAS tem sido muito importante para o arroz, onde associações têm sido encontradas para caracteres como tamanho e peso do grão, ciclo, resistência a doenças e tolerância a estresses abióticos, dentre muitos outros. QTLs de efeito maior identificados via mapeamento convencional e GWAS já tem sido introgrididos com sucesso em genótipos elite a partir de germoplasma exótico e silvestre através da seleção assistida por marcadores (revisado por McCouch et al., 2015).

O primeiro requerimento para se obter sucesso em um estudo de associação genômica ampla é a existência de satisfatória variabilidade genética dentro do painel de trabalho (HUANG; HAN, 2014). Uma boa amostragem para a seleção dos acessos que irão compor o estudo é importante, porém uma análise mais detalhada da variabilidade genética presente neste grupo de genótipos é vital, a qual pode ser

obtida, com elevada qualidade, por meio de dados de genotipagem, com denso número de marcadores. O GWAS, ainda, assim como outras abordagens de mapeamento, se baseia no fenômeno de desequilíbrio de ligação entre marcador molecular e variantes genômicas que causam diferenças no fenótipo (FLINT-GARCIA, et al., 2003). Conhecer a extensão genômica média pela qual as ligações marcador-fenótipo se mantêm satisfatoriamente associadas permite se estabelecer o número mínimo de marcadores necessários para um adequado estudo de mapeamento associativo com a população selecionada ou os quão eficientes serão os marcadores moleculares disponíveis para o estudo. Esta informação pode ser obtida pela análise de declínio do desequilíbrio de ligação.

Finalmente, o mapeamento associativo se baseia na premissa de que somente são mantidas ao longo de várias gerações de recombinação, associações verdadeiramente fortes, isto é, fruto de considerável proximidade genômica entre marcadores e locos que controlam característica de interesse. Portanto, visando minimizar a obtenção de associações espúrias entre o genótipo (marcadores) e o caráter, especialmente os “falso-positivos” se faz necessária a utilização de vários métodos estatísticos para detectar a estrutura da população e assim poder levá-la em conta nas análises de associação genótipo-fenótipo, como co-variável. Associações espúrias surgem devido à impossibilidade de amostrar o universo de constituições genéticas existentes ou mesmo pela mera inexistência de determinados recombinantes ou ainda pela distribuição desigual da frequência de determinados alelos entre subgrupos dos genótipos incluídos no estudo (NACHUMUTHU et al., 2015; revisado por SAHU; SHARMA, 2017).

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi determinar a variabilidade genética, a estrutura da população e o desequilíbrio de ligação em genótipos de arroz para avaliar sua utilização como painel para mapeamento associativo.

3.2 Material e Métodos:

3.2.1 Germoplasma

Um total de 94 acessos de arroz irrigado foram utilizados neste estudo (Tabela 1). Estes genótipos foram escolhidos de modo a amostrar a variabilidade genética do germoplasma elite de arroz utilizado no sul do Brasil. Desta forma, procurou-se selecionar genótipos desenvolvidos por diferentes instituições (BASF, Embrapa, IRGA e EPAGRI), e ao longo das últimas décadas (STRECK et al., 2018). Além das cultivares elite brasileiras, foram acrescentados genótipos estrangeiros, os quais vêm sendo utilizados nos programas de melhoramento, contribuindo com genes de tolerância a estresses abióticos, resistência a estresses bióticos, e qualidade industrial de grãos. Ainda, algumas variedades tradicionais foram incluídas, isto é, genótipos que não foram selecionados de forma convencional em programas de melhoramento, porém por agricultores, de forma tradicional. Também foram inseridas linhagens mutantes desenvolvidas através da mutação da cultivar BRS Querência, pelo Centro de Genômica e Fitomelhoramento, no Campus Capão do Leão, na Universidade Federal de Pelotas. Finalmente, uma cultivar híbrida foi incluída no painel de acessos de arroz. Outro aspecto importante, é que se procurou também amostrar alguns genótipos com caracteres especiais, ou seja, arroz aromático, com o pericarpo avermelhado e preto, uma cultivar para produção de biocombustível e cultivares para cultivo em sequeiro.

Tabela 1. Características dos 94 acessos de arroz que compõe o painel estudado.

Acessos	Empresas brasileiras	Subespécies	Tipo do acesso	Sistema de cultivo	Origem	Características especiais
Amarelo B	Variedade tradicional	<i>Japonica</i>	Variedade tradicional	Irrigado	Brasil	
Amaroo	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Austrália	
Arbório	Itália	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Itália	
Austral	-	<i>Desconhecido</i>	Cultivar	Irrigado	Desconhecido	
Basmat 370	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Paquistão	Aromático
Bluebelle	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Estados Unidos	
BR/IRGA 409	Embrapa ¹ /IRGA ²	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BR/IRGA 410	Embrapa/IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BR/IRGA 411	Embrapa/IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BR/IRGA 412	Embrapa/IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BR/IRGA 413	Embrapa/IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Brilhante	-	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Chile	
BRS 358	Embrapa	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS 6 Chui	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS 7 Taim	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS 902	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	Pericarpo avermelhado
BRS A701 CL	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS AG	Embrapa	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	Para biocombustível
BRS Agrisul	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Atalanta	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Bojuru	Embrapa	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS CIRAD 302	CIRAD (France)/Embrapa	<i>Indica</i>	Híbrido	Irrigado	Brasil	
BRS Firmeza	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	

BRS Formoso	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Fronteira	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS/IRGA 414	Embrapa/IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Ligeirinho	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Pampa	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Pampeira	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Pelota	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Querência	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
BRS Sinuelo CL	Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Cachinho	Variedade tradicional	<i>Japonica</i>	Variedade tradicional	Irrigado	Brasil	
Cacho Grande	Variedade tradicional	<i>Japonica</i>	Variedade tradicional	Sequeiro	Brasil	
Carnaroli	Itália	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Itália	
Carolina	-	<i>Japonica</i>	Cultivar	Sequeiro	EUA	
EEA 404	EEA/IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Empasc 100	Epagri ³	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Empasc 101	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Empasc 102	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Empasc 103	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Empasc 104	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	Aromático
Empasc 105	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Epagri 106	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Epagri 107	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Epagri 108	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Epagri 109	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
GURI INTA CL	BASF S.A. ⁵	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IAS 12-9 Formosa	Embrapa	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IR 8	IRRI	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Filipinas	
IRAT 124	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	

IRAT 162	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IRGA 417	IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IRGA 418	IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IRGA 419	IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IRGA 420	IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IRGA 424 CL	IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IRGA 427	IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IRGA 428	IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
IRGA 429	IRGA	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Japonês de Várzea	Variedade tradicional	<i>Japonica</i>	Variedade tradicional	Irrigado	Brasil	
Jasmine	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Tailândia	Aromático
Jasmine 85	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Tailândia	Aromático
Koschihikari	-	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Japão	
Lemont	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	EUA	
M1150	CGF ⁴	<i>Indica</i>	Linhagem mutante derivada BRS Querência	Irrigado	Brasil	
M1313	CGF	<i>Indica</i>	Linhagem mutante derivada BRS Querência	Irrigado	Brasil	
M1410	CGF	<i>Indica</i>	Linhagem mutante derivada BRS Querência	Irrigado	Brasil	
Meio Chumbinho	Variedade tradicional	<i>Indica</i>	Variedade tradicional	Irrigado	Brasil	
Nowrin Mochi	-	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Japão	
OR 63-252	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Puitá INTA-CL	BASF S.A.	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Argentina	
Qualimax	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Rexoro	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	EUA	
Sambuc	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	França	
SC 173	Epagri	<i>Indica</i>	Linhagem avançada	Irrigado	Brasil	
SC 460	Epagri	<i>Japonica</i>	Linhagem avançada	Irrigado	Brasil	
SCS 112	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	

SCS 114 Andosan	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
SCS 115 CL	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
SCS 116 Satoru	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
SCS 117 CL	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
SCS 118 Marques	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
SCS 119 Rubi	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	Pericarpo avermelhado
SCS 120 Ônix	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	Pericarpo preto
SCS 121 CL	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
SCS BRS 111	Epagri	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
SCS BRS Tio Taka	Epagri/Embrapa	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Brasil	
Selenio	-	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Itália	
Soulanet	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	França	
Tetep	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Irrigado	Vietnã	
Tomoe Mochi	-	<i>Japonica</i>	Cultivar	Irrigado	Japão	
TOX 514-16-101-1	-	<i>Indica</i>	Cultivar	Sequeiro	Nigéria	
Zebu	Variedade tradicional	<i>Japonica</i>	Variedade tradicional	Sequeiro	Desconhecido	

1 Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

2 IRGA – Instituto Rio-Grandense do Arroz.

3 Epagri – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina.

4 CGF – Centro de Genômica e Fitomelhoramento.

5 BASF S.A

3.2.2 Genotipagem e análise dos dados

Dos 94 acessos de arroz irrigado, foram coletadas folhas jovens e maceradas com nitrogênio líquido para a realização da extração de DNA, pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) (DOYLE; DOYLE 1990). As amostras de DNA foram liofilizadas e enviadas para genotipagem de acordo com as recomendações do Laboratório de Serviços de Genotipagem do IRRI (Instituto Internacional de Investigação do Arroz) - Filipinas.

O painel foi então genotipado com 7098 marcadores moleculares SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) utilizando a plataforma de genotipagem 7K Infinium SNP (Illumina®) (versão atualizada do 6K Infinium array, THOMPSON et al., 2017) no Laboratório de Serviços de Genotipagem – IRRI/Filipinas.

A filtragem dos dados, isto é, o tratamento inicial dos dados brutos gerados a partir da genotipagem, foi feita no Laboratório de Centro de Genômica e Fitomelhoramento, através do programa *TASSEL V.5.2.41* (BRADBURY et al., 2007). Foram removidos os acessos de arroz com taxa de chamada (*call rate*) < 75% (mais que 25% dos SNPs para aquele acesso não apresentavam leitura). Foram também removidos SNPs com leitura em branco (*missing data*) > 20% (para o SNP permanecer na análise é necessário que esteja presente em no mínimo 80% dos acessos) e alelos com baixa frequência (*minor allele frequency*), neste caso $\leq 5\%$ (alelos que só apareciam em até 5% nos acessos testados foram também removidos). Todas as análises realizadas neste estudo foram baseadas nos dados de genotipagem filtrados.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório do Centro de Genômica e Fitomelhoramento. A determinação dos parâmetros, heterozigosidade, conteúdo de informação polimórfica (PIC), frequência do alelo principal de cada loco, desequilíbrio de ligação (considerando uma janela de 50 SNPs) e variabilidade genética, foi obtida através do programa PowerMarker v.3.25 (LIU; MUSE, 2005). A estrutura da população foi obtida utilizando o método de agrupamento Bayesiano, efetuado no software fastSTRUCTURE (RAJ et al., 2014). Para esclarecer o resultado das estruturas, foram testados os melhores modelos contendo de 1 até 10 componentes (de $k=1$ a $k=10$), por meio do comando *Choose K.py*. De posse do resultado do modelo que melhor explica a estrutura genética deste painel, os genótipos foram arranjados nos grupos usando o software *POPHELPER* (online) (FRANCIS, 2016).

Pelo programa *TASSEL V.5.2.41*, a análise dos componentes principais (PCA) foi feita pré-estabelecendo o máximo de oito componentes, obedecendo o resultado da análise Bayesiana, porém somente o primeiro e o segundo componentes foram plotados um contra o outro. Os pontos (genótipos) foram colorizados de acordo com o agrupamento da estrutura da população. Foi construída uma árvore filogenética do tipo “sem raiz” (*unrooted*), baseada em matriz de distância genética calculada pelo parâmetro identidade por estado (*identity by state*) e no agrupamento do vizinho mais próximo (*neighbor joining*), utilizando *TASSEL V.5.2.41*. A coloração das subárvores foi novamente baseada nos grupos gerados pelo método de agrupamento Bayesiano. O declínio do desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium decay*) foi calculado por comparações pareadas entre os SNPs utilizando o parâmetro r^2 , também no software *TASSEL V.5.2.41*.

3.3 Resultados e Discussão:

Como resultado da filtragem, permaneceram 93 acessos de arroz e 4973 SNPs, cujos dados foram utilizados para todas as análises deste estudo. A cultivar Bluebelle foi o genótipo retirado das análises, por apresentar taxa de chamada de SNPs de 0,63 (abaixo de 0,75, o valor mínimo estabelecido). Foram calculados uma série de parâmetros que permitem inferir sobre a qualidade da genotipagem, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2. O conteúdo de informação polimórfica dos locos SNPs (PIC), definido como o conteúdo relativo de informação de cada marcador e especifica cada alelo tirado ao acaso da população, apresentou uma média geral de 0,2578. Este resultado foi similar aos valores encontrados em estudos prévios. Um estudo desenvolvido por Chen et al., (2011), avaliando um painel com 300 acessos de arroz, provenientes de diferentes regiões do mundo, obtiveram um valor médio de PIC de 0,285. Em outro estudo, utilizando um painel de 471 acessos de arroz da subespécie *indica*, os autores verificaram o valor de PIC de 0,2533 para acessos locais, de 0,2285 para acessos introduzidos e de 0,2465 para as variedades melhoradas Chinesas (XU et al., 2016). Sabe-se que os valores para locos relativamente informativos apresentam valores de PIC que variam de 0,25 - 0,5 e os locos com informação limitada apresentam $PIC < 0,25$ (BOTSTEIN et al., 1980). Um detalhe relevante é que os valores esperados de PIC são altamente determinados

pelo tipo de marcador estudado, desta forma, dados obtidos de marcadores SNP só podem ser comparados com resultados obtidos com este tipo de marcador.

Neste estudo, o painel foi composto na grande maioria de cultivares brasileiras, explicando o valor de PIC observando e evidenciando a estreita variabilidade genética entre os acessos. Ainda, a utilização dos marcadores SNPs caracterizados pela natureza bi-alélica, pouco informativos, limitam os estudos desenvolvidos usando este tipo de marcador. O expressivo avanço em tecnologias de sequenciamento de nova geração, as quais permitem detectar elevada quantidade de polimorfismos, têm levado ao constante incremento no número de marcadores em estudos deste tipo (MOTTA, 2016).

A heterozigosidade pode ser definida como a proporção de locos heterozigotos em um conjunto de dados. Os 93 acessos de arroz investigados apresentaram um valor considerado baixo para heterozigosidade, que foi de 0,0549 (Tabela 2). Esse resultado já era esperado, uma vez que o arroz se reproduz por autofecundação, característica de plantas autógamas, e basicamente somente cultivares elites brasileiras foram avaliadas. Por outro lado, a heterozigosidade observada pode ser explicada pela presença de um genótipo híbrido no painel, o BRS CIRAD 302, e ainda pela presença heterozigosidade residual.

A variabilidade genética ou heterozigosidade esperada é a probabilidade de dois alelos ao acaso dentro de uma população ser diferentes. O valor obtido foi de 0,3145 (Tabela 2), similar aos resultados por encontrados por Chen et al., 2011 e Xu et al., 2016. O valor baixo de heterozigosidade se justificativa pelo sistema de reprodução do arroz, como mencionado anteriormente.

A frequência de alelo principal representa a proporção do alelo mais comum em determinado loco. A frequência do alelo principal média foi de 0,7803 (Tabela 2), dessa forma verifica-se que apenas um alelo menor, o alternativo, representa a frequência que resta em cada loco, devido à natureza bi-alélica dos locos de marcadores SNPs. Alelos raros (com frequência > 5%), que podem atrapalhar a associação com os fenótipos (associações espúrias) foram retirados da análise no decorrer do processo da filtragem.

Tabela 2. Resumo das estatísticas genótípicas nos 4973 SNPs analisados que foram filtrados em um painel com 93 acessos de arroz.

Estatística	Parâmetro	Média
Estatísticas básicas	Conteúdo de informação polimórfica (PIC)	0,2578
	Heterozigosidade	0,0549
	Frequência de alelo principal	0,7803
	Variabilidade genética ou heterozigosidade esperada	0,3145
Desequilíbrio de ligação	r^2	0,2489

O coeficiente médio do quadrado da correlação de Pearson (r^2) das frequências alélicas entre dois locos tem a função de sumarizar os eventos históricos de mutação e recombinação (STICH; MELCHINGER, 2010). Neste estudo observou-se um r^2 médio de 0,2489, em uma janela de 50 marcadores SNPs. O desequilíbrio de ligação (LD) é a ocorrência de associação estatística entre alelos de diferentes locos (FLINT-GARCIA et al., 2003). Neste estudo, o parâmetro foi avaliado pelo coeficiente r^2 entre pares de locos.

O declínio do desequilíbrio de ligação (LD *decay*) que mostra como o genoma da espécie é organizada em blocos, denominados haplótipos, estimado por r^2 cai para 0,25 em aproximadamente 150 kb (Figura 1). O declínio mais lento de LD observado aqui já era esperado, já que o arroz é uma planta autógama. Em plantas alógamas, o desequilíbrio de ligação decai rapidamente, como observado em milho (FLINT-GARCIA et al., 2003). Esse parâmetro é essencial para definir a densidade dos marcadores a serem utilizados para cobertura do genoma alvo em estudos de associação genômica ampla (FLINT-GARCIA et al., 2003; ZHANG et al., 2016). Embora seja recomendado um grande número de marcadores para estudos de mapeamento associativo, o declínio tardio do desequilíbrio de ligação observado neste estudo indica que os 4973 SNPs de elevada qualidade utilizados são satisfatórios para o estudo de associação genômica ampla para o painel de acessos

de arroz irrigado avaliado. Estes resultados reforçam as conclusões de Mather et al, (2007).

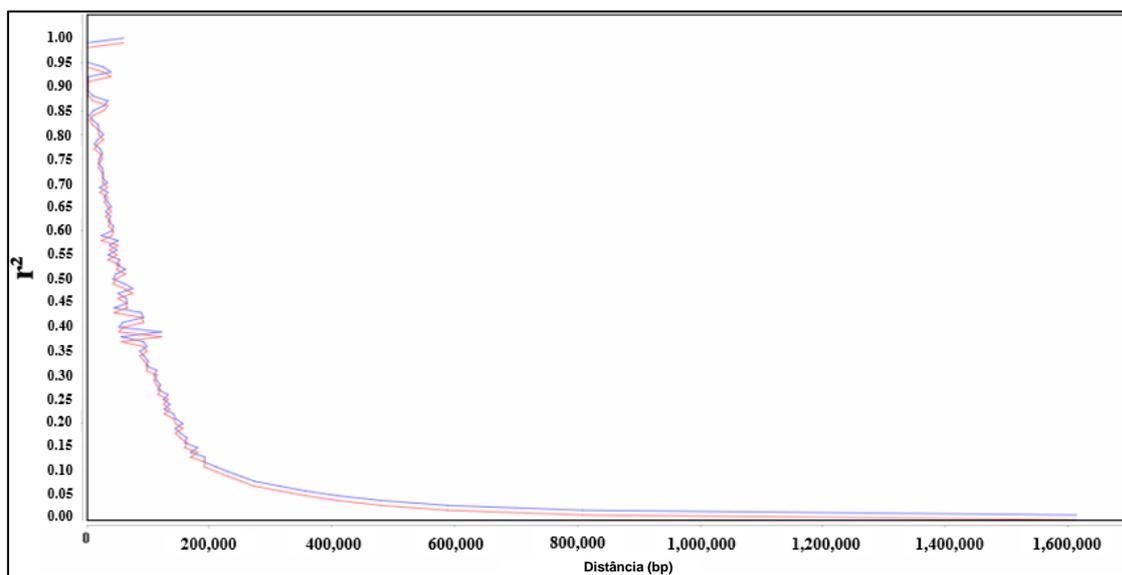


Figura 1. Gráfico de declínio do desequilíbrio de ligação entre locos ao longo do genoma, para 93 acessos de arroz avaliados para 4973 locos SNP.

O método de agrupamento bayesiano foi selecionado para formação da estrutura genética dos 93 acessos de arroz no painel. O número de componentes do modelo que melhor explicam a estrutura dos dados foram oito, obedecendo os parâmetros do algoritmo aplicado, evidenciando a presença de oito subpopulações (Figura 2 e Tabela 3).

Nesse estudo, um acesso foi considerado como membro do grupo quando pelo menos 60% do genótipo corresponde àquele grupo, proporção demonstrada pela linha que corta a figura (Figura 2). Deste modo, 82 acessos de arroz compõem subpopulações distintas, e 11 genótipos são determinados como constituição genética mista (Tabela 3). Sabe-se que o painel utilizado é composto principalmente por cultivares brasileiras, e o método agrupou parte dos acessos de acordo com os programas de melhoramento que foram desenvolvidos. Para exemplificar tem-se a subpopulação 1, no qual nove dos onze acessos foram desenvolvidos pela empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) (Tabela 3). Isto evidencia a “assinatura” do melhorista na estrutura da população, fenômeno identificado quando observando outros painéis de arroz (ALI et al., 2011; XIE et al., 2015). Ainda, as subpopulações 4 e 7 foram compostas basicamente pelas cultivares

da subespécie *japonica* (Tabela 3). Foi observado que o grupo 2 é a maior subpopulação, apresentando 36 acessos, pertencentes a diferentes programas de melhoramento (Tabela 3). Isso demonstra a restrita variabilidade genética disponível para os melhoristas para o desenvolvimento e lançamento de novas cultivares na região Sul do Brasil, como demonstrado previamente por Raimondi et al. (2014).

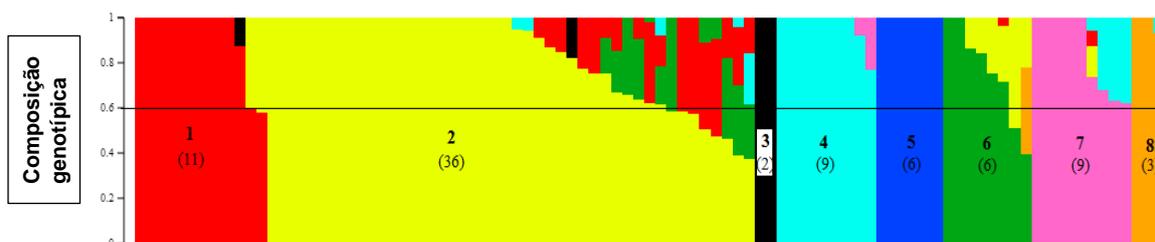


Figura 2. Estrutura genética da população de acessos de arroz estudados obtida através do agrupamento Bayesiano. O número de acessos de cada subgrupo formado está demonstrado entre parênteses – para um acesso ser considerado como pertencente a um grupo este deve apresentar no mínimo 60% da sua composição genotípica característica deste grupo, conforme linha traçada. Genótipos que não apresentam este critério são considerados de constituição genética mista.

Tabela 3. Estrutura da população dos acessos de arroz de acordo com o agrupamento Bayesiano.

Sub-populações (agrupamento Bayesiano)	Acessos	Número
Grupo 1	Zebu	1
	Epagri 108	2
	SCS 118 Marques	3
	SCS 120 Ônix	4
	Epagri 109	5
	SCS 114 Andosan	6
	SCS BRS Tio Taka	7
	SCS 112	8
	SCS 121 CL	9
	SCS 115 CL	10
	IRGA 427	11
Constituição genética mista	SCS 117 CL	
Grupo 2	BRS Atalanta	1
	BRS/IRGA 414	2
	Empasc 104	3
	BR/IRGA 409	4
	BR/IRGA 413	5
	IRGA 417	6

	BRS 6 Chui	7
	Cachinho	8
	Empasc 101	9
	Guri INTA-CL	10
	Sambuc	11
	Puitá INTA-CL	12
	Jasmine 85	13
	BR/IRGA 412	14
	BRS Fronteira	15
	BRS Pampa	16
	Empasc 103	17
	BRS Agrisul	18
	BRS Pelota	19
	Meio Chumbinho	20
	BRS Pampeira	21
	Basmat 370	22
	IRGA 420	23
	IRGA 418	24
	Lemont	25
	Jasmine	26
	Empasc 102	27
	BRS 7 Taim	28
	IRGA 424 CL	29
	IRGA 419	30
	IR 8	31
	SCS 116 Satoru	32
	SCS 119 Rubi	33
	IRAT 124	34
	BRS Formoso	35
	BRS CIRAD 302	36
Constituição genética mista	Empasc 105	
Constituição genética mista	IRGA 428	
Constituição genética mista	IRGA 429	
Constituição genética mista	SC 460	
Constituição genética mista	SCS BRS 111	
Constituição genética mista	SC 173	
Constituição genética mista	Epagri 107	
Constituição genética mista	EEA 404	
Grupo 3	BRS Sinuelo CL	1
	BRS A701 CL	2
Grupo 4	Amarelo B	1
	IRAT 162	2
	BR/IRGA 411	3
	BRS Firmeza	4
	Carolina	5
	Nowrin Mochi	6
	Cacho Grande	7
	Empasc 100	8
	Tomoe Mochi	9

Grupo 5	BRS Querência	1
	BRS Ligeirinho	2
	IAS 12-9 Formosa	3
	M1150	4
	M1313	5
	M1410	6
Grupo 6	BR/IRGA 410	1
	BRS 358	2
	BRS 902	3
	OR 63 252	4
	TOX 514-16-101-1	5
	Austral	6
Constituição genética mista	Epagri 106	
Constituição genética mista	Tetep	
Grupo 7	BRS Bojuru	1
	Selenio	2
	Amaroo	3
	Koschihikari	4
	Brilhante	5
	Soulanet	6
	Carnaroli	7
	BRS AG	8
	Arbório	9
Grupo 8	Rexoro	1
	Qualimax	2
	Japonês de Várzea	3

Na análise dos componentes principais (PCA), os dois primeiros componentes explicam aproximadamente 50% da variação genética (PC1~ 42% e PC2 ~ 8%) do painel de arroz (Figura 3). A estrutura complexa observada, constituída de oito subgrupos, impossibilita uma separação clara dos grupos quando plotado apenas os componentes PC1 e PC2, porém os genótipos das subespécies *japonica* e *indica* apresentam uma nítida separação. Quando observado a árvore filogenética (Figura 4), percebe-se a concordância com o método Bayesiano, exceto para o subgrupo 6.

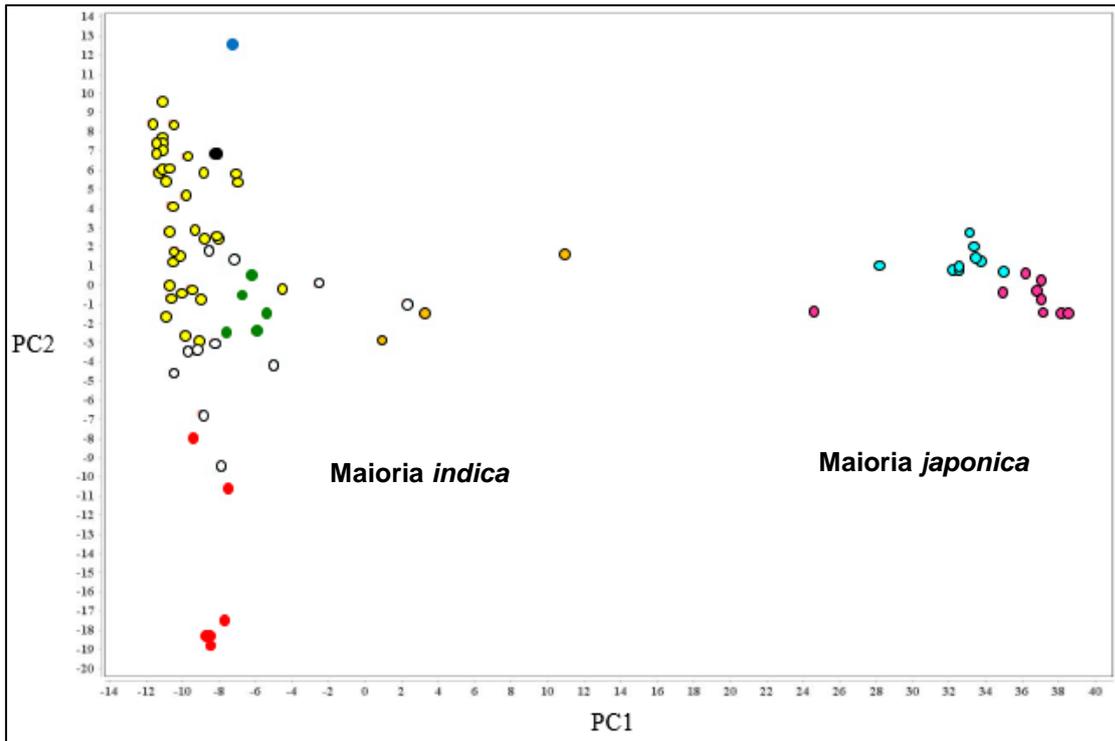


Figura 3. Análise de componentes principais para 93 acessos de arroz avaliados em 4973 locos SNP.

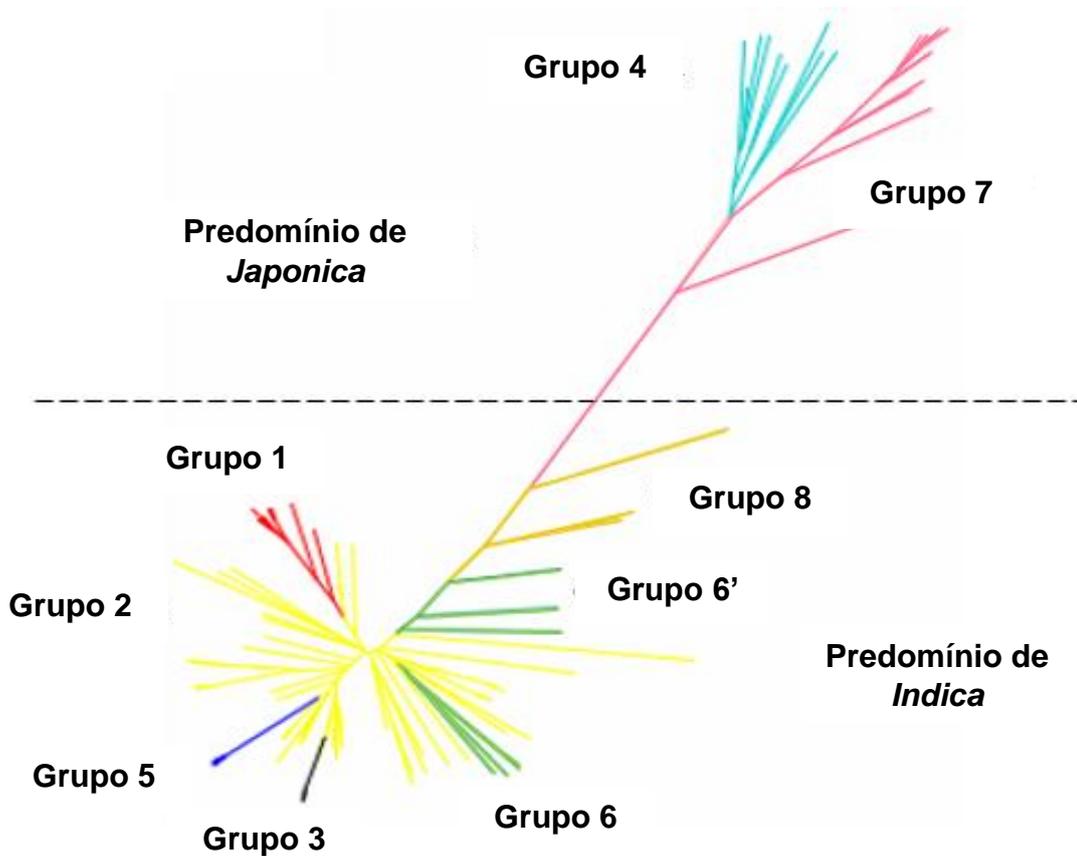


Figura 4. Árvore filogenética sem raiz baseada em matriz de distâncias pelo parâmetro identidade por estado e método de agrupamento do vizinho mais próximo. As cores dos ramos na árvore filogenética seguem os resultados do agrupamento Bayesiano

Apesar da quantidade de acessos e marcadores SNPs ser de alguma forma restrito, os acessos de arroz escolhidos e a qualidade dos SNPs que foram filtrados, permitem que o estudo de mapeamento associativo seja feito, devido aos dados da estrutura da população e o grau de parentesco entre os acessos. Para elevar a robustez da análise estima-se que outros genótipos sejam genotipados e consequentemente incluídos no painel. Finalmente, pressupõe-se que este estudo colabore nas pesquisas de programas de melhoramento, para desenvolver estratégias de associação genômica ampla tendo em vista beneficiar o trabalho dos melhoristas de arroz, e entendendo também as dificuldades do uso desse tipo de estudo na cultura orizícola (VERDEPRADO et al.; 2018).

Com relação a estreita variabilidade genética observada, ou seja, a erosão genética, sabe-se que é um problema decorrente do acentuado uso de genótipos de preferência do produtor, principalmente em fazendas. Além disso, é consequência também dos programas de melhoramento genéticos, com intuito de elevar a produção em países em desenvolvimento para suprir a necessidade da população durante a revolução verde (GOVINDARAJ et al., 2015). Sabe-se que o potencial genético para o desenvolvimento de cultivares decresceu continuamente nas últimas épocas em diversos países, relacionados ao uso frequente dos mesmos acessos nos cruzamentos proporcionando um estreitamento da base genética, mesmo que ainda apresenta uma variabilidade genética acessível dentro do germoplasma desse cereal (ALJUMAILI et al.; 2018).

3.4 Conclusão

Com base nos parâmetros avaliados verificou-se a estreita variabilidade genética entre os acessos, contudo, o painel de genótipos de arroz selecionado, bem como os SNPs analisados são suficientes para estudos de associação genômica ampla.

3.5 Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo CNPq - Brasil, sob o nº 401902 / 2016-1. O CNPq, a CAPES e a FAPERGS também forneceram as bolsas para os pesquisadores e estudantes envolvidos. E finalmente a Embrapa pelo fornecimento de sementes.

3.5 Referências Bibliográficas:

ALJUMAILI, S. J.; RAFII, M. Y.; LATIF, M. A.; SAKIMIN, S. Z.; AROLU, I. W.; MIAH, G. Genetic diversity of aromatic rice germplasm revealed by SSR markers. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-11, 2018.

ALI, M. L.; MCCLUNG, A. M.; JIA, M. H.; KIMBALL, J. A.; MCCOUCH, S. R.; GEORGIA, C. E. A rice diversity panel evaluated for genetic and agromorphological diversity between subpopulations and its geographic distribution. **Crop Science**, v. 51, n. 5, p. 2021-2035, 2011.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D. E.; CASSTEVENS, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E. S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, v. 23, n. 19, p. 2633-2635, 2007.

CHEN, W.; GAO, Y.; XIE, W.; GONG, L.; LU, K.; WANG, W.; LI, Y.; LIU, X.; ZHANG, H.; DONG, H.; ZHANG, W.; ZHANG, L.; YU, S.; WANG, G.; LIAN, X.; LUO, J. Genome-wide association analyses provide genetic and biochemical insights into natural variation in rice metabolism. **Nature genetics**, v. 46, n. 7, p. 714-724, 2014.

CHEN, H.; HE, H.; ZOU, Y.; CHEN, W.; YU, R.; LIU, X.; YANG, Y.; GAO, Y. M.; XU, J. L.; FAN, L. M. Development and application of a set of breeder-friendly SNP markers for genetic analyses and molecular breeding of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical Applied Genetics**, v. 123, n. 6, p. 869-879, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produção de Arroz**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 23 de janeiro de 2019.

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

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. IV. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 357-374, 2003.

FRANCIS, R. M. POPHELPER: an R package and web app to analyze and visualize population structure. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 1, p. 27-32, 2016.

GOVINDARAJ, M.; VETRIVENTHAN, M.; SRINIVASAN, M. Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. **Genetics Research International**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

HUANG, X., HAN, B. Natural Variations and Genome-Wide Association Studies in Crop Plants. **Annual Review Plant Biology**, v. 65, p. 531-551, 2014.

KUMAR, V. SINGH, A.; MITHRA, S. V.; KRISHNAMURTHY, S. L.; PARIDA, S. K.; JAIN, S.; TIWARI, K. K.; KUMAR, P.; RAO, A. R.; SHARMA, S. K.; KHURANA, J. P.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). **DNA Research**, v. 22, p. 133-145, 2015.

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

MATHER, K. A.; CAICEDO, A. L.; POLATO, N. R.; OLSEN, K. M.; MCCOUCH, S.; PURUGGANAN, M. D.; The extent of linkage disequilibrium in rice (*Oryza sativa* L.). **Genetics**, v. 177, n. 4, p. 2223-2232, 2007.

MCCOUCH, S. R.; WRIGHT, M. H.; TUNG, C. W.; MARON, L. G.; MCNALLY, K.; FITZGERALD, M.; SINGH, N.; DECLERCK, G.; AGOSTO-PEREZ, F.; KORNILIEV, P.; GREENBERG, A. J.; NAREDO, M. E. B.; MERCADO, S. M. Q.; HARRINGTON, S. E.; SHI, Y.; BRANCHINI, D. R.; KUSER-FALCÃO, P. R.; LEUNG, H.; EBANA, K.; YANO, M.; EIZENGA, G.; MCCLUNG, A.; MEZEY, J. Open access resources for genome-wide association mapping in rice. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-14, 2015.

MENGUER, P. K.; SPEROTTO, R. A.; RICACHENEVSKY, F. K. A walk on the wild side: *Oryza* species as source for rice abiotic stress tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 238-252, 2017.

MOTTA, L. B. **Genotipagem por sequenciamento para identificação de SNPs e associação com características agronômicas em *Coffea canephora***. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.

MUTHAYYA, S.; SUGIMOTO, J. D.; MONTGOMERY, S.; MABERLY, G. F. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1324, p. 7-14, 2014.

NACHIMUTHU, V. V.; MUTHURAJAN, R.; DURAIALAGURAJA, S.; SHIVAKAMI, R.; PANDIAN, B. A.; PONNIAH, G.; GUNASEKARAN, K.; SWAMINATHAN, M.; K, K. S.; SABARIAPPAN, R. Analysis of population structure and genetic diversity in rice germplasm using SSR markers: an initiative towards association mapping of agronomic traits in *Oryza sativa*. **Rice**, v. 8, n. 3, 2015.

NADEEM, M, A.; NAWAZ, M. A.; SHAHID, M. Q.; DOĞAN, Y.; COMERTPAY, G.; YILDIZ, M.; HATIPOĞLU, R.; AHMAD, F.; ALSALEH, A.; LABHANE, N.; ÖZKAN, H.; CHUNG, G.; BALOCH, F. S. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 261-285, 2018.

RAIMONDI J. V.; MARSCHALEK R., NODARI, R. O. Genetic base of paddy rice cultivars of Southern Brazil. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 194-199, 2014.

RAJ, A.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. FastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 573-589, 2014.

SAHU, P. K.; SHARMA, D. Linkage disequilibrium mapping as an advancement in crop breeding. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 6, n. 2, p. 40-41, 2017.

STICH, B.; MELCHINGER, A. E. An introduction to association mapping in plants. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 5, n. 39, p.1-9, 2010.

STRECK, E. A.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; AGUIAR, G. A.; FACCHINELLO, P. K. H.; FAGUNDES, P. R. R.; FRANCO, D. F.; NARDINO, M.; COSTA DE OLIVEIRA, A.

Genetic Progress in 45 Years of Irrigated Rice Breeding in Southern Brazil. **Crop Science**, v. 58, p. 1094-1105, 2018.

THOMSON, M. L.; SINGH, N.; DWIYANTI, M. S.; WANG, D. R.; WRIGHT, M. H.; PEREZ, F. A.; DECLERCK, G.; CHIN, J. H.; MALÍTICO-LAYAOEN, G. A.; JUANILLAS, V. M.; DILLA-ERMITA, C. J.; MAULEON, R.; KRETZSCHMAR, T.; MCCOUNCH, S. R.; Largescale deployment of a rice 6K SNP array for genetics and breeding applications. **Rice**, v. 10, n. 40, 2017.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Publications rice**. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov>. Acesso em 23 de janeiro de 2019.

VENSKE, E.; STAFEN, C. F.; OLIVEIRA, V. F.; MAIA, L. C.; MAGALHÃES JUNIOR, A. M.; MCNALLY, K. L.; COSTA DE OLIVEIRA, A.; PEGORARO, C. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and population structure in a panel of Brazilian rice accessions. **Journal of Applied Genetics**, v. 60, p. 27-31, 2018.

VERDEPRADO, H.; KRETZSCHMAR, T.; BEGUM, H.; RAGHAVAN, C.; JOYCE, P.; LAKSHMANAN, P.; COBB, J. N.; COLLARD, B. C. Association mapping in rice: basic concepts and perspectives for molecular breeding. **Plant Production Science**, v. 21, n. 3, p. 159-176, 2018.

XIE, W.; WANG, G.; YUAN, M.; YAO, W.; LYU, K.; ZHAO, H.; YANG, M.; LI, P.; ZHANG, X.; YUAN, J.; WANG, Q.; LIU, F.; DONG, H.; ZHANG, L.; LI, X.; X MENG, X.; ZHANG, W.; XIONG, L.; ELE, Y.; WANG, S.; YU, S.; XU, C.; LUO, J.; LI, X.; XIAO, J.; LIAN, X.; ZHANG, Q. Breeding signatures of rice improvement revealed by a genomic variation map from a large germplasm collection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 39, p. 5411-5419, 2015.

XU, Q.; YUAN, X.; WANG, S.; FENG, Y.; YU, H.; WANG, Y.; YANG, Y.; WEI, X.; LI, X. The genetic diversity and structure of indica rice in China as detected by single nucleotide polymorphism analysis. **BMC Genetics**, v. 17, n. 5, 2016.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. DE. Artigo Composição Arroz. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

ZHANG, P.; ZHONG, K.; SHAHID, M. Q.; TONG, H. Association analysis in rice: from application to utilization. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1202, p. 1-16, 2016.

4 CAPÍTULO II - Mapeamento associativo para tolerância à salinidade em uma amostra do germoplasma de arroz brasileiro

4.1 Introdução

Os estresses abióticos são um problema mundial na agricultura, os quais afetam a produtividade das plantas cultivadas, sendo os principais a salinidade, seca e o calor. A salinidade é uma das restrições ambientais que ocorre principalmente em regiões áridas e semi-áridas, mas também em outras regiões do mundo (SAKADEVAN; NGUYEN, 2010). Sabe-se que cerca de 1 bilhão de hectares apresentam elevados teores de sais e 20% dos solos que são irrigados são afetados pela água utilizada para irrigação, composta por pequenas porções de cloreto de sódio (FAO, 2015; TESTER; DAVENPORT, 2003).

A toxicidade pelo excesso de sal representa uma enorme ameaça para o rendimento das lavouras orizícolas, especialmente quando cultivado em zonas costeiras, já que água utilizada para irrigação pode estar contaminada pela água do Oceano, fenômeno que ocorre com frequência no Rio Grande do Sul. Os genótipos de arroz apresentam diferentes respostas ao estresse salino, nos genótipos sensíveis, as limitações na produtividade ocorrem em índices de salinidade superiores à 30mM (3 dS m⁻¹) de NaCl (ISMAIL; HORIE, 2017) e a sobrevivência das plantas fica comprometida em concentrações de 70 mM (7 dS m⁻¹) de NaCl (YEO et al., 1990).

O arroz é mais vulnerável ao estresse salino durante aos estádios de plântula e no florescimento (ZENG et al., 2002). A salinidade acumulada no solo provoca efeitos deletérios causando uma redução na taxa de crescimento, prejudica a expansão celular e o crescimento das folhas, o processo fotossintético, causa diminuição do número de afilhos férteis e do índice de perfilhamento, e acelera a senescência das folhas mais velhas (MUNNS; TESTER, 2008; SIRALUT et al., 2009). Esses danos são decorrentes do estresse osmótico, ocasionado pela presença de sal no solo, que altera o potencial osmótico, ou do estresse iônico, ocasionado pelo excesso do íon Na⁺ nos tecidos vegetais (MUNNS; TESTER, 2008).

Quando o cultivo de arroz é feito em regiões costeiras aos oceanos, um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético é o desenvolvimento de cultivares tolerantes à salinidade (WANG et al., 2012). A obtenção de cultivares tolerantes capazes de manter a produtividade em condições de estresse salino está associada a segurança alimentar, uma vez que o arroz é um alimento básico para a grande parte da população mundial (KHUSH, 2005). Contudo, a característica tolerância à salinidade é definida como quantitativa, controlada por muitos genes cujos

produtos estão envolvidos em inúmeros processos moleculares, bioquímicos e fisiológicos, associados a eliminação de íons na raiz, regulação de potenciais osmóticos das células, divisão de íons tóxicos em tecidos e componentes das células, controle de crescimento e desintoxicação de metabólitos intermediários ativos (MUNNS; TESTES, 2008; PANDIT et al., 2010; YU et al., 2017).

Desta forma, a identificação de genes que controlam a tolerância ao estresse salino é fundamental. Através dos avanços das tecnologias de sequenciamento de próxima geração é possível conhecer as variações genéticas dos indivíduos com base no sequenciamento do genoma inteiro ou de apenas uma região-alvo, o que possibilita a realização de estudos de mapeamento de ligação, estudo de associação genômica ampla (GWAS), mapeamento fino e o processo de clonagem de genes de interesse agrônômico (LI et al., 2012). Dentre essas ferramentas biotecnológicas, o estudo de associação genômica ampla tem trazido resultados promissores para a genética de plantas.

O mapeamento associativo ou GWAS é realizado a partir de dados de genotipagem e fenotipagem de inúmeros acessos pertencentes a um germoplasma, sendo um método promissor para mapear e identificar QTLs associados a diferentes caracteres de interesse agrônômico, como a tolerância a salinidade. Estudos de GWAS fornecem dados que podem ser utilizados diretamente no melhoramento de arroz, como por exemplo, a seleção assistida por marcadores nos locos associados as características de interesse (ASHIKARI et al., 2006; MIURA et al., 2011). Considerando que o arroz apresenta um desequilíbrio de ligação longo, o que corresponde que um loco abrange múltiplos genes candidatos, GWAS parece ser eficiente para mapear locos subjacentes aos caracteres de interesse e identificar genes-alvos associados a essas características (HAN; HUANG et al., 2013).

Estudos de GWAS, para tolerância à salinidade em arroz, têm sido desenvolvidos, e têm trazido resultados muito importantes. No entanto, nenhum estudo utilizando germoplasma brasileiro em fase de plântula tem sido conduzido, dessa forma, o objetivo deste estudo foi mapear regiões genômicas associadas à tolerância à salinidade em um painel de acessos de arroz cultivados no Brasil.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Germoplasma

Para a composição do painel, um conjunto de 94 acessos de arroz foi selecionado para o estudo, buscando amostrar a variabilidade genética existente no banco de germoplasma de arroz da região Sul do Brasil. Para a seleção dos acessos foi levado em consideração as instituições obtentoras (BASF, Embrapa, IRGA e EPAGRI), e os genótipos que apresentam importância nos programas de melhoramento, como cultivares estrangeiras para a introdução de genes de resistência a patógenos e tolerância a estresses abióticos, variedades tradicionais para ampliar a base genética do programa, linhagens mutantes desenvolvidas por meio de mutação, derivadas da cultivar BRS Querência e cultivar híbrida. Genótipos de tipos especiais, ou seja, aromáticos, com epiderme colorida (vermelho e preto) e com baixo teor de amilose, também foram incluídos na amostra do germoplasma utilizado.

4.2.2 Genotipagem

Foi realizada a coleta de folhas jovens dos 94 acessos de arroz, e as amostras foram fixadas em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram maceradas e submetidas a extração de DNA pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (DOYLE; DOYLE 1990). O envio do DNA para o Laboratório de Serviços de Genotipagem do IRRI (Instituto Internacional de Investigação do Arroz), nas Filipinas, ocorreu após a liofilização das amostras.

A genotipagem dos 94 acessos de arroz foi feita utilizando 7098 marcadores moleculares SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único), usando a plataforma 7K *Infinium SNP* (Illumina®) (versão atualizada 6K *Infinium array*), do Laboratório de Serviços de Genotipagem do IRRI/Filipinas (THOMPSON et al., 2017).

Posteriormente, a análise dos respectivos dados de genotipagem foi realizada através do software *TASSEL V.5.2.41* (BRADBURY et al., 2007). Um procedimento de filtragem foi feito nos acessos retirando os que apresentavam taxas de chamada (*call rates*) < 75% (acima de 25% dos SNPs para determinado acesso não exibiu leitura). Foram removidos também marcadores moleculares SNPs com dados ausentes (*missing data*) > 20% (para o SNP continuar na análise necessita estar frequente no mínimo em 80% dos acessos de arroz) e alelos com frequência menor

que $\leq 5\%$ (*minor allele frequency* - alelos que apenas surgiam até 5% nos acessos analisados).

Para a formação da estrutura da população foi aplicado o método de agrupamento Bayesiano, executado no programa *fastSTRUCTURE* (RAJ et al., 2014). Para elucidar a construção das estruturas, foram selecionados os componentes de modelos a partir de $k = 1$ até $k = 10$, através do comando *Choose K.py*. Para a obtenção da matriz de parentesco, pelo método de identidade por estado (*IBS – Identity by State*), foram utilizados os dados de genotipagem e, novamente, o software *TASSEL V.5.2.41* (BRADBURY et al., 2007). As matrizes de estrutura da população e de parentesco são utilizadas como co-variáveis no modelo misto de associação genômica ampla, visando diminuir a ocorrência de falso-positivos.

4.2.3 Fenotipagem

Para fenotipagem foi utilizado um conjunto de 67 acessos, submetidos ao estresse salino no estágio de plântula em cultivo hidropônico, sob condições de ambiente controlado no Laboratório de Hidroponia, localizado no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF), da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), na Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão – RS, Brasil. Os experimentos foram conduzidos de agosto a outubro de 2018, no total de 14 dias cada repetição.

O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizados, com cinco repetições. Considerando a restrição de espaço e a dificuldade em avaliar grande número de plântulas em um mesmo dia, os blocos foram distribuídos no tempo, de modo que o experimento completo contendo uma repetição de cada um dos acessos foi repetido cinco vezes (as cinco repetições). As sementes foram primeiramente desinfestadas com álcool na concentração de 70% (v/v), por um período de um minuto, na sequência foram lavadas com água destilada, em seguida submersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 4% (v/v) por cinco minutos e ao final as sementes foram lavadas duas vezes com água destilada para eliminar os resíduos dos agentes desinfestantes.

Após a desinfestação, as sementes dos 67 acessos foram alocadas em gerbox para germinação, utilizando uma folha de germitest, dividida em duas e dobradas em forma de gaita de modo que obtivesse no mínimo 10 calhas disponíveis. Foram semeadas em torno de 50 sementes de cada genótipo, com quantidade de água

destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato, colocadas em câmara germinadora (BOD) a 25°C, com fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa mínima requerida para a germinação das sementes, conforme as normas estabelecidas pela Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), permanecendo nestas condições durante 7 dias.

Posteriormente, aproximadamente 10 plântulas, apresentando comprimento de raiz uniforme (cerca de 5 mm), foram transplantadas para telas de nylon, adaptadas em tampas de recipientes de 750mL. Essa estrutura permite a sustentação das plântulas e o crescimento do sistema radicular devido ao contato permanente com a solução nutritiva padrão para arroz, preparada de acordo com o protocolo modificado de Yoshida et al. (1981) (controle) e com a solução nutritiva acrescida de 40mM de NaCl (estresse salino). Os recipientes foram colocados em tanque hidropônico com iluminação artificial, com fotoperíodo de 16h e temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para a composição da solução nutritiva “controle” de Yoshida modificada utilizou-se: nitrato de amônio - NH_4NO_3 (91,40 g L^{-1}), sulfato de potássio - K_2SO_4 (97,80 g L^{-1}), fosfato monopotássio - KH_2PO_4 (29,00 g L^{-1}), fosfato dipotássio - K_2HPO_4 (8,00 g L^{-1}), cloreto de cálcio dihidratado - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (117,36 g L^{-1}), sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (324,00 g L^{-1}), micronutrientes (cloreto de manganês - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,50 g L^{-1}), molibdato de amônia - $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,074 g L^{-1}), ácido bórico - H_3BO_3 (0,934 g L^{-1}), sulfato de zinco - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,035 g L^{-1}), e sulfato de cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,031 g L^{-1}), e por fim sulfato ferroso quelado com ácido EDTA - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{EDTA}$ (1:2) (7,92g + 3,19g) (ELEC, 2013; SINGH, 2010). Para a solução do estresse salino, foi utilizada a mesma composição da solução “controle”, porém foi adicionado a concentração de 40 mM de NaCl. A escolha da concentração foi baseada nos estudos desenvolvidos por Khan et al (1997), que relataram a concentração de 40mM de NaCl como limiar para o estágio de plântula de arroz. Após o preparo da solução foi feito o ajuste do pH de 4,5, utilizando o ácido HCl ou a base NaOH e posteriormente fixado com o reagente químico MES [monohydrate: 2 - (N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate]. As soluções nutritivas não foram trocadas, apenas foi acrescentado água destilada para suprir a evapotranspiração.

As plântulas foram analisadas aos 7 dias através da avaliação das variáveis: comprimento de parte aérea (cpa), comprimento de raiz (cr), massa seca de parte aérea (mspa) e massa seca de raiz (msr). As análises de comprimento foram feitas com

auxílio da régua graduada e os resultados foram expressos em centímetros. Para o peso da massa seca, se procedeu a secagem dos materiais vegetais na estufa, em temperatura de 70°C até atingir peso constante, e logo realizado a pesagem em balança de precisão (Marte®).

Para o tratamento dos dados, os resultados das avaliações de cada repetição foram transformados em termos de desempenho relativo para cada variável, que corresponde à simples diferença entre o resultado obtido na condição controle e àquele na condição de estresse salino, para cada genótipo (Equação 1). Por fim, os valores médios foram utilizados no programa *TASSEL V.5.2.41* para o mapeamento associativo (BRADBURY et al., 2007).

Equação 1: Desempenho relativo (DR)

$$DR_x = D_{x0} - D_{x1}$$

Sendo DR_x , o desempenho relativo do genótipo em questão na variável “X”, D_{x0} , o desempenho deste genótipo na condição controle e D_{x1} , o desempenho deste na condição de estresse salino. Este cálculo foi feito para cada repetição.

4.2.4 Análise do Mapeamento associativo

Para a análise do mapeamento associativo foi utilizado o modelo linear misto (MLM) para cada variável avaliada. Para a composição da análise quatro conjuntos de dados foram integrados: os dados da genotipagem previamente filtrados, a matriz de estrutura da população, a matriz de parentesco e os dados fenotípicos.

Posterior a essa análise, através dos resultados obtidos foi gerado um gráfico de “Manhattan Plot” para cada variável mensurada. Esses gráficos permitem visualizar QTNs subjacentes a QTLs pelos “picos”, também chamados “sinais” ou “hits”, demonstrando a associação estatística de marcadores com a característica ao longo de um cromossomo. O eixo y representado por $-\log_{10}(\text{valor } P)$ para a associação plotados contra os SNPs ao longo de cada cromossomo e no eixo x estão indicadas as posições de todos os marcadores SNPs utilizados (VERDEPRADO et al., 2018).

4.3 Resultados e Discussão

Nos gráficos Manhattan plot, para cada variável avaliada foi adotado um limiar de significância diferente. Para o comprimento de parte aérea foi utilizado um limiar de 2,40, para o comprimento de raiz o limiar foi de 2,80, para a massa seca de parte aérea utilizou-se um limiar de 3,40 e para a massa seca de raiz o limiar adotado foi de 2,40. Os valores de limiar foram arbitrários, definidos com base na presença dos picos. Neste estudo foram mapeados 7 QTNs associados a resposta à salinidade (Figuras 1, 2, 3 e 4). Detectaram-se QTNs para todas as características avaliadas, localizados em diferentes cromossomos.

Para a variável comprimento de parte aérea foram mapeados dois QTNs significativos, um localizado no cromossomo 6 e outro localizado no cromossomo 10 (Figura 1). Em estudo desenvolvido por Yu et al. (2017), avaliando o comprimento de parte aérea de plântulas em 295 acessos de arroz sob estresse salino, os autores também encontraram um QTN no cromossomo 6, porém em posição diferente da encontrada nesse estudo. A participação de regiões genômicas do cromossomo 6 na resposta a salinidade da parte aérea de arroz também foi descrita por Koyama et al. (2001) e De Leon et al. (2016), que identificaram três genes candidatos associados a essa característica.

Em outro estudo conduzido com 219 acessos de arroz, avaliando o estágio de germinação sob estresse salino, foi mapeado um QTN no cromossomo 6, subjacente a um QTL que explica 9,2% da variância fenotípica, e dois genes candidatos (*Os06g30390* e *Os06g30440*) foram identificados (NAVEED et al., 2018). Por fim, um QTL com efeito aditivo foi encontrado no cromossomo 10 quando se avaliou uma população de RILs (linhagens endogâmicas recombinantes) derivadas de um cruzamento de dois genótipos, um da subespécie *indica* e outro *japonica*, mapeado para a concentração de K⁺ na parte aérea, explicando 12,1% da variação fenotípica (WANG et al., 2012). Os resultados obtidos nos diferentes estudos reforçam a evidência de que há genes localizados no cromossomo 6 associados à resposta da parte aérea de plantas de arroz submetidas à salinidade.

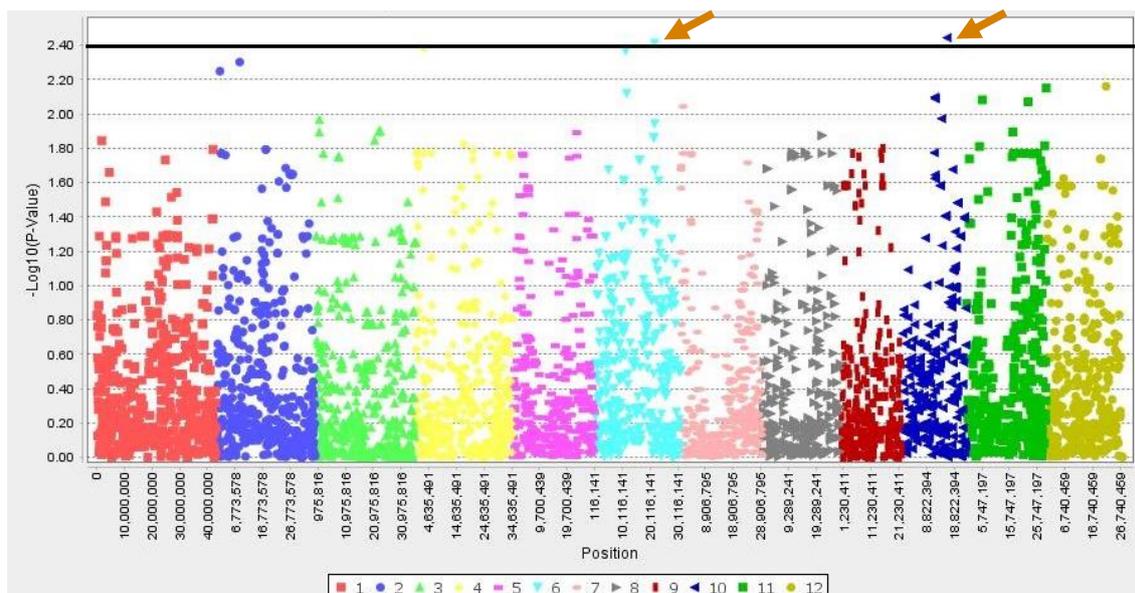


Figura 1: Manhattan plot para a associação caractere – SNP quanto ao desempenho relativo entre as condições de controle e estresse, para comprimento de parte aérea. As setas mostram os SNPs mais significativos.

Na variável comprimento de raiz apenas um QTN associado à resposta à salinidade foi mapeado, o qual está situado no cromossomo 9 (Figura 2). Estudos de mapeamento de ligação também detectaram QTLs associados a resposta a salinidade nesse mesmo cromossomo. Em um estudo considerando uma população de RILs com 150 linhagens de arroz sob estresse salino, utilizando marcadores AFLPs e avaliando absorção de potássio (K^+) pela raiz, um QTL foi encontrado também no cromossomo 9 (FLOWERS et al., 2000). Similarmente, em uma população de RILs com 80 linhagens, submetidas a condições de estresse ao excesso de sal, avaliando a relação sódio/potássio (Na^+/K^+) na raiz e utilizando marcadores SSRs, foi mapeado outro QTL, novamente localizado no cromossomo 9 (THOMPSON, 2010). Em outro estudo de mapeamento, um QTL associado a absorção de sódio (Na^+) na raiz também foi encontrado neste mesmo cromossomo (SINGH et al., 2007).

O mapeamento prévio desses três QTLs no cromossomo 9 sugere que o QTN identificado nesse estudo pode estar relacionado com a absorção de potássio, com a concentração de Na^+ na raiz ou com relação Na^+/K^+ . Contudo, devido ao não conhecimento da localização específica dos QTLs relatados por Flowers et al. (2000), Singh et al. (2007) e Thompson et al. (2010), o QTN encontrado pode estar próximo a um dos QTLs relatados, ou ainda pode estar associado a um quarto QTL, uma vez que a fenotipagem não foi a mesma.

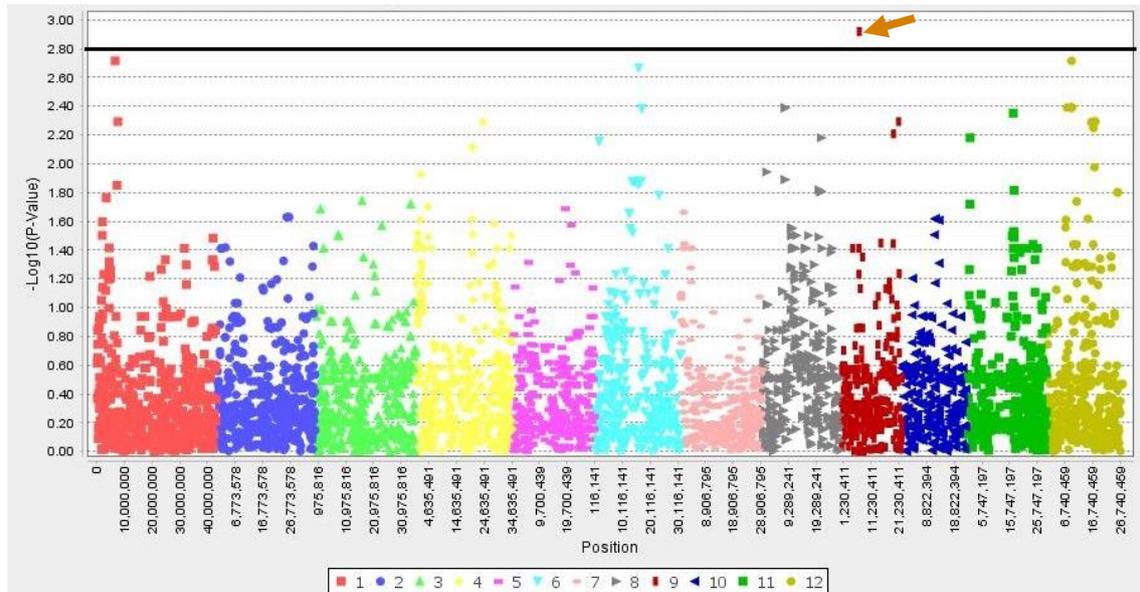


Figura 2: Manhattan plot para a associação caractere – SNP quanto ao desempenho relativo entre as condições de controle e estresse, para comprimento de raiz. A seta mostra o SNP mais significativo.

Quando considerada a variável massa seca de parte aérea, verificou-se a presença de um QTN significativo, localizado no cromossomo 11 (Figura 3). Em um estudo de associação genômica ampla, dois QTNs posicionados no cromossomo 11, relacionados a tolerância à salinidade, também foram mapeados por Yu et al. (2017), no entanto neste estudo, os autores avaliaram a massa seca total, que envolve tanto a massa seca da parte aérea quanto a massa seca da raiz. Ainda no cromossomo 11 foram identificados 4 genes candidatos associados a tolerância ao excesso de sal, considerando a característica massa seca total (LEON et al. 2016). Um dos QTNs mapeados por Yu et al., (2017) está situado no braço curto desse cromossomo, assim como o QTN identificado no presente estudo, sugerindo que esses QTNs podem estar localizados em regiões próximas, subjacente ao mesmo gene candidato.

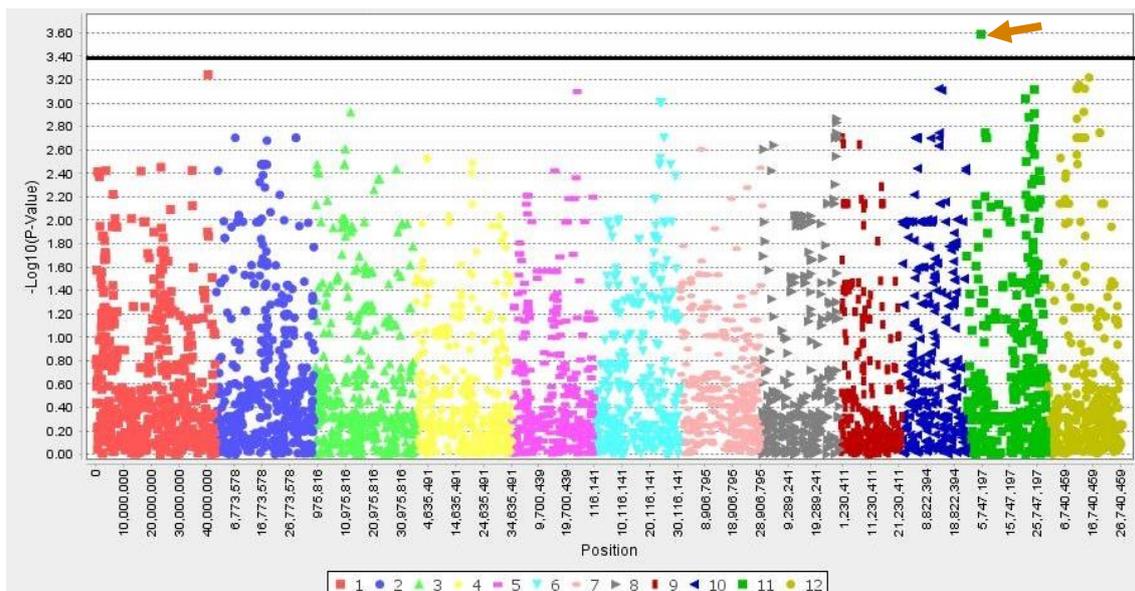


Figura 3: Manhattan plot para a associação caractere – SNP quanto ao desempenho relativo entre as condições de controle e estresse, para massa seca de parte aérea. A seta mostra o SNP mais significativo.

Considerando a massa seca de raiz foram mapeados três QTNs, um situado no cromossomo 5 e dois localizados no cromossomo 9 (Figura 4). Estudo de GWAS relacionado à tolerância a estresse salino também detectou dois QTNs no cromossomo 5, todavia o caractere avaliado foi a massa seca total (YU et al., 2017). Inclusive 3 genes candidatos foram identificados nesse mesmo cromossomo. Além disso, o QTN descrito por Yu et al. (2017) está no mesmo braço, denominado braço longo, que o QTN identificado no Manhattan plot, sugerindo que esses QTNs estejam próximos, apresentando a chance de cobrir o mesmo gene.

Em um estudo de mapeamento de ligação em uma população de 133 linhas de arroz na geração F₃, avaliado o caractere massa seca de raiz e utilizando marcadores RFLPs foi identificado um QTL no cromossomo 9, que afeta a concentração de sódio (Na⁺), que explica 16,7% da variância fenotípica para a tolerância à salinidade (LIN et al., 2004). Em outro estudo de mapeamento de QTLs para tolerância ao excesso de sal, foram identificados três QTLs localizados no cromossomo 9 e que estão associados a absorção de potássio (K⁺), concentração de sódio (Na⁺) na raiz e peso de raiz (SINGH et al., 2007). Esses resultados trazem indícios que o cromossomo 9 apresenta sequências genômicas importantes relacionados à resposta das raízes em condições de estresse salino.

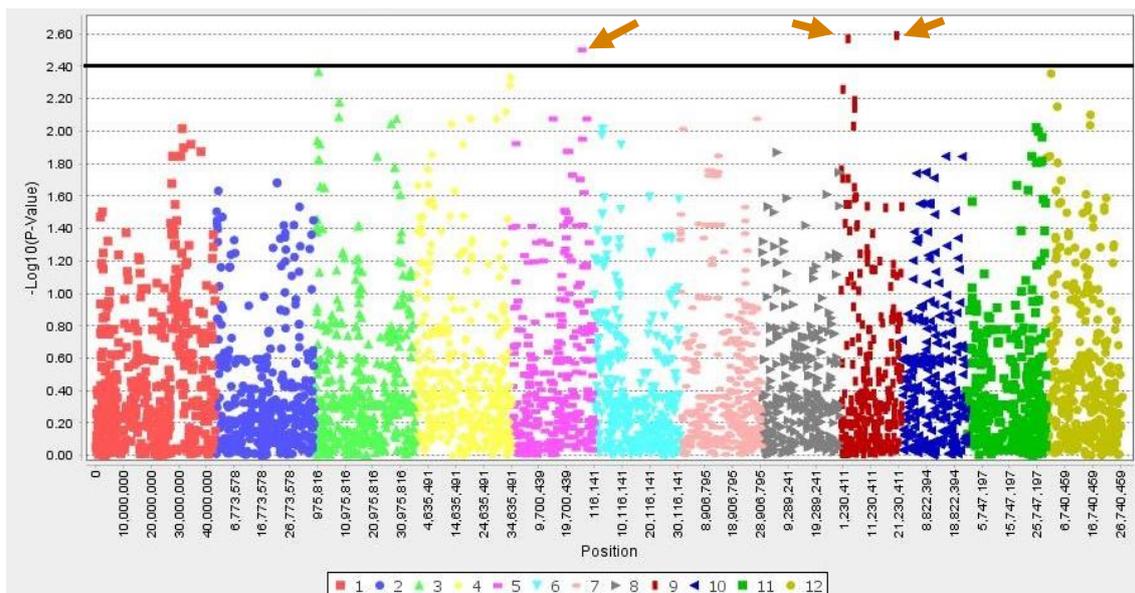


Figura 4: Manhattan plot para a associação caractere – SNP quanto ao desempenho relativo entre as condições de controle e estresse, para a massa seca de raiz. As setas mostram os SNPs mais significativos.

Todos os QTNs encontrados no presente estudo estão localizados em cromossomos que já foram caracterizados por apresentar sequências genômicas associadas à resposta do arroz a salinidade. No entanto, ainda não é possível saber se correspondem as mesmas regiões mapeadas previamente. Para maior precisão dos resultados, mais 94 acessos brasileiros serão incluídos na análise, e a fenotipagem em condição de salinidade será repetida utilizando todos os genótipos. Após confirmação dos QTNs será feito uma busca na região genômica buscando QTLs e genes candidatos. Posteriormente esses genes serão analisados quanto a sua função na resposta ao estresse salino. Após validação poderão ser desenvolvidos marcadores moleculares para seleção indireta no processo de melhoramento de arroz e ainda, estudos de expressão, transgenia e edição genômica serão conduzidos com os genes identificados.

Por fim, cabe destacar que esse é o primeiro estudo de GWAS para identificar regiões genômicas associadas à resposta à salinidade, em plântulas de arroz, utilizando um painel composto majoritariamente por acessos cultivados no Brasil. Com isso, esse estudo traz as primeiras informações relacionadas a base genética que controla a resposta a salinidade de genótipos de arroz brasileiros.

4.4 Conclusões

Sete QTNs subjacentes a QTLs associados a tolerância à salinidade em genótipos de arroz cultivados no Brasil foram mapeados nesse estudo.

4.5 Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo CNPq - Brasil, sob o nº 401902 / 2016-1. O CNPq, a CAPES e a FAPERGS também forneceram as bolsas para os pesquisadores e estudantes envolvidos. E finalmente a Embrapa pelo fornecimento de sementes.

4.6 Referências Bibliográficas:

- ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. Identification, isolation, and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 344-350, 2006.
- BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D. E.; CASSTEVENS, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E. S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, v. 23, n. 19, p. 2633-2635, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV. 365p, 2009.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- DE LEON, T. B.; LINScombe, S.; SUBUDHI, P. K. Molecular dissection of seedling salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using a high-density GBS-based SNP linkage map. **Rice**, v. 9, n. 52, p. 1-22, 2016.
- ELEC, V.; QUIMIO, C. A.; MENDOZA, R.; SAJISE, A. G. C.; BEEBOUT, S. E. J.; GREGORIO, G. B.; SINGH, R. K. Maintaining elevated Fe²⁺ concentration in solution culture for the development of a rapid and repeatable screening technique for iron toxicity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, v. 372, n. 1-2, p. 253-264, 2013.
- FAO. **Status of the World's Soil Resources**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nation. Chapter 6: Global soil status, processes and trends, 2015, 167 p.
- FLOWERS, T. J.; KOYAMA, M. L.; FLOWERS, S. A.; SUDHAKAR, C.; SINGH, K. P.; YEO, A. R. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 342, p. 99-106, 2000.
- HAN, B.; HUANG, X. Sequencing-based genome-wide association study in rice. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 133-138, 2013.

ISLAM, M. S.; ONTOY, J.; SUBUDHI, P. K. Meta-Analysis of Quantitative Trait Loci Associated with Seedling-Stage Salt Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) **Plants**, v. 8, n. 2, p. 1-18, 2019.

ISMAIL, A. M.; HORIE, T. Molecular breeding approaches for improving salt tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 1-30, 2017.

KHAN, M. S. A.; HAMID, A.; KARIM, M. A. Effect of sodium chloride on germination and seedling characters of different types of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 179, p. 163-169, 1997.

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

KOYAMA, M. L.; LEVESLEY, A.; KOEBNER, R.; FLOWERS, T. J.; YEO, A. R. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. **Plant Physiology**, v. 125, p. 406-422, 2001.

LI, G.; KWON, S. W.; PARK, Y. J. Updates and perspectives on the utilization of molecular markers of complex traits in rice. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4157-4168, 2012.

LIN, H. X.; ZHU, M. Z.; YANO, M.; GAO, J. P.; LIANG, Z. W.; SU, W. A.; HU, X. H.; REN, Z. H.; CHAO, D. Y. QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 2, p. 253-260, 2004.

MIURA, K.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. The role of qtls in the breeding of high-yielding rice. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 319-326, 2011.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.

NAVEED, S. A.; ZHANG, F.; ZHANG, J.; ZHENG, T. Q.; MENG, L. J.; PANG, Y. L.; XU, J. L.; LI, Z. K. Identification of QTN and candidate genes for Salinity Tolerance at the Germination and Seedling Stages in Rice by Genome-Wide Association Analyses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 6505, p. 1-11, 2018.

PANDIT, A.; RAI, V.; BAL, S.; SINHA, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, M.; GAUTAM, R. K.; SINGH, R.; SHARMA, P. C.; SINGH, A. K.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T. R.; MOHAPATRA, T.; SINGH, N. K. Combining QTL mapping and transcriptome profiling of bulked RILs for identification of functional polymorphism for salt tolerance genes in

rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Genetics & Genomics**, v. 284, n. 2, p. 121-136, 2010.

RAJ, A.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. FastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 573-589, 2014.

SAKADEVAN, K.; NGUYEN, M. L. Extent, impact, and response to soil and water salinity in arid and semiarid regions. **Advances in Agronomy**, v. 109, p. 55-74, 2010.

SINGH, R. S.; GREGORIO, G. B.; JAIN, R. K. QTL mapping for salinity tolerance in rice. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 13, n. 2, p. 87-99, 2007.

SINGH, R.K.; REDOÑA, E.D.; REFUERZO, L. Varietal improvement for abiotic stress tolerance in crop plants: special reference to salinity in rice. In: PAREEK, A.; SOPORY, S.K.; BOHNERT, H.J.; GOVINDJEE (Eds). **Abiotic stress adaptation in plants: physiological, molecular and genomic foundation**. New York: Springer, p. 387-415, 2010.

SIRAULT, X. R. R.; JAMES, R. A.; FURBANK, R. T. A new screening method for osmotic component of salinity tolerance in cereals using infrared thermography. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 11, p. 970-977, 2009.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

THOMPSON, M. J.; OCAMPO, M. D.; EGDANE, J.; RAHMAN, M. A.; SAJISE, A. G.; ADORADA, D. L.; TUMIMBANG-RAIZ, E.; BLUMWALD, E.; SERAJ, Z. I.; SINGH, R. K.; GREGORIO, G. B.; ISMAIL, A. M. Characterizing the *Salto1* Quantitative Trait Locus for Salinity Tolerance in Rice. **Rice**, v. 3, n. 2-3, p. 148-160, 2010.

THOMSON, M. L.; SINGH, N.; DWIYANTI, M. S.; WANG, D. R.; WRIGHT, M. H.; PEREZ, F. A.; DECLERCK, G.; CHIN, J. H.; MALÍTICO-LAYAOEN, G. A.; JUANILLAS, V. M.; DILLA-ERMITA, C. J.; MAULEON, R.; KRETZSCHMAR, T.; MCCOUNCH, S. R. Largescale deployment of a rice 6K SNP array for genetics and breeding applications. **Rice**, v. 10, n. 40, 2017.

VERDEPRADO, H.; KRETZSCHMAR, T.; BEGUM, H.; RAGHAVAN, C.; JOYCE, P.; LAKSHMANAN, P.; COBB, J. N.; COLLARD, B. C. Association mapping in rice: basic concepts and perspectives for molecular breeding. **Plant Production Science**, v. 21, n. 3, p. 159-176, 2018.

WANG, Z.; CHEN, Z.; CHENG, J.; LAI, Y.; WANG, J.; BAO, Y.; HUANG, J.; ZHANG, H. QTL analysis of Na⁺ and K⁺ concentrations in roots and shoots under different levels of NaCl stress in rice (*Oryza sativa* L.). **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51202, 2012.

YEO, A. R.; YEO, M. E.; FLOWERS, S. A.; FLOWERS, T. J. Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, n. 3, p. 377-384, 1990.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. The International Rice Research Institute, Philippines, 269p. 1981.

YU, J.; ZAO, W.; Q, H.; KIM, T. S.; PARQUE, Y, J. Genome-wide association study and gene set analysis for understanding candidate genes involved in salt tolerance at the rice seedling stage. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 292, n. 6, p. 1391-1403, 2017.

ZENG, L.; SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameters. **Euphytica**, v.127, p. 235-245, 2002.

5. Considerações Finais

O arroz é importante para a alimentação e economia do Brasil e de várias partes do mundo, porém a expansão acentuada da salinização do solo e da água afeta adversamente o crescimento, desenvolvimento e especialmente a produtividade das plantas. Dessa forma, a geração de informações que contribuam para o melhoramento genético para a tolerância a este agente estressor, deve beneficiar grandemente a cadeia produtiva mundial do cereal. Neste sentido, dois estudos foram realizados, os quais apresentados nesta obra como Capítulo I e Capítulo II.

O capítulo I objetivou determinar a variabilidade genética, a estrutura da população e o desequilíbrio de ligação em genótipos de arroz para avaliar sua utilização como painel para mapeamento associativo. Foi demonstrado que o germoplasma amostrado apresenta variabilidade genética relativamente restrita, desequilíbrio de ligação entre marcadores extenso e a estrutura da população formada por oito grupos. Apesar destas considerações, pode-se concluir que o painel selecionado e os SNPs avaliados apresentam elevada qualidade para serem aplicados em estudos de mapeamento associativo.

O Capítulo II, objetivou mapear regiões genômicas associadas à tolerância à salinidade em um painel de acessos de arroz cultivados no Brasil. Foram mapeados sete QTNs relacionados a resposta à salinidade, para quatro caracteres avaliados, sendo dois QTNs nos cromossomos seis e dez, relacionados com o comprimento de parte aérea em resposta à salinidade, um QTN mais expressivo no cromossomo nove associado ao comprimento de raiz em resposta à salinidade, um QTN significativo no cromossomo onze quando avaliado em massa seca de parte aérea em resposta à salinidade e três QTNs identificados nos cromossomos cinco e nove associados a massa seca de raiz em resposta à salinidade. Após validação, estes QTNs podem ser convertidos a marcadores moleculares para a seleção assistida com vistas ao desenvolvimento de cultivares com melhorada tolerância à salinidade. Ainda, com base na posição destes locos, é possível se estudar QTL subjacentes no sentido de identificar genes candidatos e melhor compreender a arquitetura genética da característica.

A tolerância à salinidade em arroz é uma característica altamente demandada e uma série de fatores tornam o melhoramento genético para este caráter complexo. Os resultados obtidos neste estudo devem contribuir para compreender este processo.

6. Referências Bibliográficas da Introdução Geral

CASTILLO, E. G.; TUONG, T. P.; ISMAIL, A. M.; INUBUSHI, K. Response to Salinity in Rice: Comparative Effects of Osmotic and Ionic Stresses. **Plant Production Science**, v. 10, n. 2, p. 159-170, 2007.

FRAGA, T. I.; CARMONA, F. C.; ANGHINONI, I.; JUNIOR, S. A. G.; MARCOLIN, E. Flooded rice yield as affected by levels of water salinity in different stages of its cycle. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, p. 175-182, 2010.

JIANG, Y.; CAI, Z.; XIE, W.; LONG, T.; YU, H.; ZHANG, Q. Rice functional genomics research: progress and implications for crop genetic improvement. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1059-1070, 2012.

LI, Y.; XIAO, J.; CHEN, L.; HUANG, X.; CHENG, Z.; HAN, B.; ZHANG, Q.; WU, C. Rice Functional Genomics Research: Past Decade and Future. **Molecular Plant**, v. 11, p. 359-380, 2018.

NEGRÃO, S.; COURTOIS, B.; AHMADI, N.; ABREU, I.; SAIBO, N.; OLIVEIRA, M. M. Recent Updates on Salinity Stress in Rice: From Physiological to Molecular Responses. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 4, p. 329-377, 2011.