

Juliana Vieira Raimondi

**Estudo genético da característica espiguetas agrupadas em arroz
(*Oryza sativa* L.)**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Doutora em Ciências.

Orientador: Dr. Rubens Onofre Nodari

Coorientador : Dr. Rubens Marschalek

Florianópolis, SC
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Raimondi, Juliana Vieira

Estudo genético da característica espiguetas agrupadas em arroz (*Oryza sativa* L.) / Juliana Vieira Raimondi ; orientador, Rubens Onofre Nodari ; co-orientador, Rubens Marschalek. - Florianópolis, SC, 2013.

106 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Parâmetros Genéticos. 3. Caracterização molecular. 4. Deriva de glifosato. 5. Mutação Natural. I. Nodari, Rubens Onofre. II. Marschalek, Rubens. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

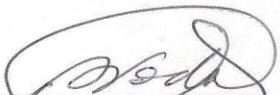
Estudo genético da característica espiguetas agrupadas em arroz (*Oriza sativa* L.)

por

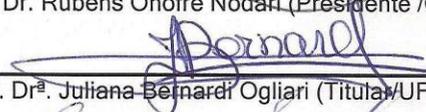
Juliana Vieira Raimondi

Tese julgada e aprovada em 11/10/2013, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

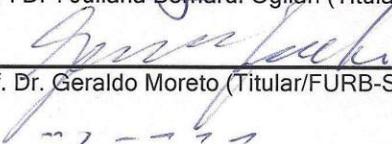
Banca Examinadora:



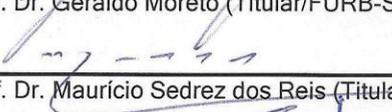
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Presidente /Orientador)



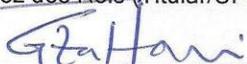
Profª. Drª. Juliana Bernardi Ogliari (Titular/UFSC-CCA)



Prof. Dr. Geraldo Moreto (Titular/FURB-SC)



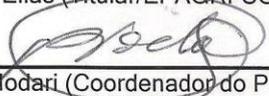
Prof. Dr. Mauricio Sedrez dos Reis (Titular/UFSC-CCA)



Prof. Dr. Gilmar Roberto Zaffari (Titular/EPAGRI-Itajai)



Prof. Dr. Haroldo Tavares Elias (Titular/EPAGRI-SC)



Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, outubro de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas maravilhosas oportunidade que sempre tive disponível em minha vida.

À minha família pelo incentivo e confiança sempre depositada.

Aos orientadores Rubens Onofre Nodari e Rubens Marshalek pelo compartilhamento de sabedoria e paciência.

Aos pesquisadores do Projeto Arroz Irrigado da Epagri-EEI¹ pelos 14 anos de verdadeira amizade e por ter me proporcionado a melhor escola de vivência pessoal e profissional.

Aos técnicos agrícolas do Projeto Arroz Irrigado da Epagri-EEI, Samuel Batista dos Santos e Geovani Porto, pela eficiência no apoio cedido e pela amizade sempre disponível.

A equipe do laboratório de biologia molecular da Epagri-EEI por todo carinho e profissionalismo.

Ao colega Dr. Gilmar Roberto Zaffari por sempre dispor de amizade, atenção e conhecimento para melhoria do projeto.

À Epagri-EEI por todo apoio e suporte disponibilizados para a execução do projeto.

À Acapsa – Associação Catarinense dos Produtores de Sementes de Arroz pelo apoio cedido.

A todos os colegas da Epagri-EEI pela confiança, carinho e amizade.

¹ EEI = Estação experimental de Itajaí

**Humildade e muito amor são essenciais
para o alcance da Vitória!**
Juliana Vieira Raimondi

Dedico

*Ao meu marido, Vagner Raimondi
pelo seu grandioso amor, e a
minha filha Izadora Raimondi por
ser a razão da minha vida.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
Introdução	03
Arroz	04
Genoma do Arroz	07
Melhoramento genético de arroz	07
Melhoramento genético de arroz em Santa Catarina	09
Mutação e a estrutura floral do arroz	11
Característica espiguetas agrupadas	12
Objetivos	15
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos	15
Capítulo I. Análise genética da característica espiguetas agrupadas em arroz	16
Introdução	17
Material e Métodos	20
Resultado e Discussão	23
Conclusões	43
Capítulo II. Efeito do fenótipo espiguetas agrupadas sobre características agronômicas em linhas endogâmicas recombinantes de arroz	44
Introdução	45
Material e Métodos	46
Resultado e Discussão	48
Conclusões	50
Capítulo III. RM 6446 e RM 20330 como marcadores para caracterizar o fenótipo espiguetas agrupadas em arroz	52
Introdução	53
Material e Métodos	57
Resultado e Discussão	60
Conclusões	64
Capítulo IV. Efeito de deriva de glifosato como indutor da característica espiguetas agrupadas em arroz	65
Introdução	66

Material e Métodos	69
Resultado e Discussão	69
Conclusões	78
Capítulo V. Conclusões Gerais	79
Capítulo VI. Considerações para o melhoramento genético de arroz irrigado.	80
Bibliografia	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Característica espiguetas agrupadas em panícula do acesso Multiespigueta.	13
Figura 2. Evolução da produtividade de arroz em Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Brasil, de 1976 a 2012.	17
Figura 3. Tipos de cultivares de arroz	19
Figura 4. Genitores utilizados para obtenção de populações segregantes para a característica espiguetas agrupadas	21
Figura 5. Panículas dos genitores SCSBRS Tio Taka, SC 339 e Multiespigueta.	22
Figura 6. Descritores para característica espiguetas agrupadas.	23
Figura 7. Fenótipo de plantas F ₁ descendentes do cruzamento entre SC 339 x Multiespigueta, SCSBRS Tio Taka x Multiespigueta e os respectivos cruzamentos recíprocos.	24
Figura 8. Distribuição de frequência de progênies nas gerações F ₁ , F ₁ RC ₁ , F ₂ , e dos genitores do cruzamento SC 339 x Multiespigueta.	26
Figura 9. Representação genotípica para a mutação espiguetas agrupadas em arroz, considerando um gene no controle da expressão deste fenótipo	27
Figura 10. Percentagem de populações geneticamente estabilizadas para o fenótipo tipo de panícula (Tipo 1, 2, 3 e 4), e populações segregando nas gerações F ₅ , F ₆ e F ₇	29
Figura 11. Esquema didático da descrição genotípica dos loci 1 e 2.	31
Figura 12. Segregação observada para tipo de panícula nas gerações F ₁ e F ₂ admitindo que o gene da mutação sofre epistasia de um segundo gene.	32

Figura 13. Modelo proposto para explicar a frequência genotípica de progênies F ₂ admitindo a hipótese do gene da mutação sofrer epistasia com envolvimento de um segundo gene, sendo ambos ligados a 30 cM.....	33
Figura 14. Análise com marcador microssatélite RM 20330, caracterizando LERs que apresentam a característica espiguetas agrupadas com o alelo de 260 pb (A) e LERs simples (que não possuem as espiguetas agrupadas) com o alelo de 265 pb.	63
Figura 15. Panículas da linhagem SC 450 CL com a característica espiguetas agrupadas, fenótipo tipo 2 e 3.	66
Figura 16. Percentagem da expressão do fenótipo espiguetas agrupadas em duas variedades de arroz submetidas a diferentes doses de glifosato em três estádios de desenvolvimento (V9, R0 e R1).	71
Figura 17. Expressão do fenótipo espiguetas agrupadas em panículas de arroz da linhagem SC 450 CL após aplicação de 5, 10 e 20% de glifosato nos estádios R0 e R1.	71
Figura 18. Tamanho de panícula, número de grãos por panícula e distância entre grãos de duas variedades de arroz em três estádios de desenvolvimento após aplicação de glifosato nas dosagens 0, 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha).	72
Figura 19. Número de ramificações primárias, número de grãos por ráquis e altura de plantas de duas variedades de arroz em três estádios de desenvolvimento após aplicação de glifosato nas dosagens 0, 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha).	73
Figura 20. Panículas de arroz da cultivar SCS117 CL em três estádios de desenvolvimento (V9, R0 e R1) após aplicação de 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha) de glifosato.	76
Figura 21. Panículas de arroz da linhagem SC 450 CL em três estádios de desenvolvimento (V9, R0 e R1) após aplicação de 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha) de glifosato.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Região de origem, número de cromossomos e tipo de genoma das espécies do gênero <i>Oryza</i>	06
Tabela 2. Cultivares de arroz irrigado desenvolvidas e lançadas pela Epagri.	10
Tabela 3. Descritores para característica espiguetas agrupadas em arroz (Marschalek e Vieira, dados não publicados)	22
Tabela 4. Características fenotípicas de populações F ₁ oriundas dos cruzamentos entre Multiespigueta x SC 339 e Multiespigueta com SCSBRS Tio Taka, e seus recíprocos.	24
Tabela 5. Segregação observada na geração F ₂ para característica espiguetas agrupadas em arroz, envolvendo dois cruzamentos e seus recíprocos.	26
Tabela 6. Teste de X ² para hipótese de um gene envolvido no controle da característica espiguetas agrupadas, a partir da segregação de progênies F ₂	28
Tabela 7. Descrição dos genótipos e seu respectivo fenótipo e detalhes da ação de cada genótipo, com base na hipótese de o gene da mutação sofrer epistasia de um segundo gene, ambos ligados com 30 cM.	34
Tabela 8. Teste de X ² a partir da segregação de progênies F ₂ , de acordo com a hipótese de o gene da mutação sofrer efeito de epistasia de um segundo gene, ambos ligados em repulsão com 30 cM.	35
Tabela 9. Teste de X ² a partir da segregação de progênies F ₁ RC ₁ , de acordo com a hipótese de o gene da mutação sofrer efeito epistático de um segundo gene, ambos ligados em repulsão com 30 cM.	36
Tabela 10. Número de plantas, fenótipo e genótipo nas gerações F ₆ e F ₇ descendentes de progênies F ₅ , oriundas do cruzamento entre Multiespigueta e SC 339, admitindo a hipótese do gene da mutação sofrer efeito epistático de um segundo gene, ambos ligados em	

repulsão com 30 cM	37
Tabela 11. Fenótipo de plantas F ₁ de cruzamentos dialélicos entre linhagens F7 de arroz.	42
Tabela 12. Frequência, segregação e qui-quadrado de progênies F ₂ oriundas do cruzamento dialélico de arroz envolvendo a característica espiguetas agrupadas.	42
Tabela 13. Fenótipo de linhagens de arroz e três testemunhas.	47
Tabela 14. Características agronômicas de linhas endogâmicas recombinantes (LERs) descendentes do cruzamento entre SC 339 com Multiespigueta, e três testemunhas.	51
Tabela 15. Bulks de linhas endogâmicas recombinantes de arroz oriundas do cruzamento SC 339 com Multiespigueta, e seus respectivos fenótipos.	58
Tabela 16. Marcadores SSR utilizados para caracterizar o fenótipo espiguetas agrupadas em LERs de arroz.	58
Tabela 17. Amplificação dos alelos 260 pb e 265 pb com o marcador RM 20330, através das dez plantas de arroz constituintes dos bulks	61

Estudo genético da característica espiguetas agrupadas em arroz (*Oryza sativa* L.)

RESUMO

A característica espiguetas agrupadas em arroz tem origem por mutação natural e apresenta de duas a três espiguetas agrupadas no mesmo nó do raquis da panícula, enquanto que em variedades normais encontra-se apenas uma espiguetas. No Brasil, a primeira observação da deste fenótipo foi na Epagri-EEI em Itajaí, SC em 1996, permitindo a obtenção do acesso Multiespigueta, e também em Formoso do Araguaia, TO em 2006, pela Embrapa-CNPAP obtendo-se o acesso CNA 10928. Como é uma característica pouco frequente em arroz, estudos a cerca dos mecanismos genéticos, caracterização molecular e outras curiosidades ainda são pouco compreendidos. O objetivo deste trabalho foi estudar: i) as bases genéticas envolvidas no controle da característica, ii) os efeitos deste fenótipo sobre características agrônômicas importantes, iii) verificar se os marcadores RM 6446 e RN 20330 caracterizam o fenótipo em descendentes de Multiespigueta assim como foi verificado com populações oriundas de CNA 10928, iv) estudar o efeito de deriva de Glifosato sobre a expressão do fenótipo em questão. A característica espiguetas agrupadas em arroz é controlada por um gene que sofre efeito de epistasia de um segundo gene, ambos ligados em 30 cM com interação alélica de co-dominância. As melhores produtividades foram obtidas com linhagens de panículas do tipo 4 (espiguetas não agrupadas) seguidos do tipo 1 e 2 (agrupadas em diferentes graus), respectivamente. A característica espiguetas agrupadas não contribuiu significativamente para a melhoria dos componentes de rendimentos para as linhagens de arroz avaliadas. O SSR RM 6446 não é polimórfico para a característica em estudo. Já o marcador RM 20330 caracterizou eficientemente linhagens de panículas agrupadas os quais apresentaram o alelo de 260 pb, e linhagens de panículas não agrupadas apresentaram o alelo 265 pb. Com os testes de deriva de glifosato, foi possível também, levantar a hipótese de que este herbicida atue no sítio de atuação do hormônio citocinina, e que este, por sua vez, controle a expressão da característica espiguetas agrupadas. Esta hipótese poderá ser testada futuramente.

Genetic study of the characteristic clustered spikelets in rice (*Oryza sativa* L.)

ABSTRACT

The phenotype clustered spikelets in rice is originated by natural mutation and to show two to six clustered spikelets on the same node of the rachis of the panicle, whereas in normal varieties is just one spikelet. In Brazil that mutation was observed by Epagri-EEI in Itajaí, SC, allowing to obtain access Multiespigueta, and also in Formoso do Araguaia, Tocantins, by Embrapa-CNPAP, named access CNA 10928. Since it is a trait with low frequent in rice, studies about the genetic mechanisms, molecular characterization and other related issues are still poorly understood. Thus, the aims of this work were: i) to characterize the genetic basis involved in the control of the trait, ii) to measure the effects of this phenotype on important agronomic characteristics, iii) to check if the markers RM 6446 and RM 20330 could be use to identify the phenotype in descendants of Multiespigueta as well as segregating populations deriving from CNA 10928, iv) to identify the effect of glyphosate on the expression of parental distinct phenotypes. The characteristic clustered spikelets in rice is controlled by a gene that undergoes epistatic effect of a second gene, both linked at 30 cM, and the allelic interaction is co-dominance. The highest yield was obtained by lines with panicles type 4 (spikelets ungrouped) followed by lines of types 1 and 2 (grouped in different degrees), respectively. The characteristic spikelets clustered did not contribute significantly to the improvement of the yield components for the evaluated rice lines. SSR RM 6446 was not polymorphic for the trait under study. However, marker RM 20330 characterized efficiently plants with clustered panicles (260 bp allele versus not clustered panicles with 265 bp allele). Through fumigation of glyphosate on normal plants, progeny exhibited clustered spikelets. Thus, it is possible to hypothesize that this herbicide might acts at the site of action of the hormone cytokinin, and this, in turn, control the expression of the characteristic spikelets clustered. This hypothesis can be tested in the future.

Estudo genético da característica espiguetas agrupadas em arroz (*Oryza sativa* L.)

Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um alimento base na dieta alimentar de mais da metade da população mundial sendo o terceiro cereal mais produzido no mundo. Pode ser utilizado de diversas formas, que vão desde alimentação humana direta (arroz integral, branco ou parboilizado, arroz glutinoso, arroz aromático); e indireta, como arroz quebrado (sub-produto do beneficiamento, utilizado na indústria de barras de cereais), óleo do grão de arroz, grãos de arroz macerados inseridos no malte de cevada para a produção de cervejas; farelo de arroz como alimentação animal (especialmente para suínos, aves e peixes); produção de etanol e energia elétrica (a combustão da palha de arroz é utilizada para a movimentação de turbinas termoelétricas), entre outros.

O consumo *per capita* mundial de arroz, segundo a FAO, é de 58 kg/hab/ano, com uma demanda crescente nos últimos seis decênios (ICEPA, 2012). Os maiores consumos *per capita* estão localizados na China, Birmânia e Indonésia, com uma média de 80 kg/hab/ano. Já o Brasil tem um consumo *per capita* em nível intermediário, que oscila entre 40 e 60 kg/hab/ano, enquanto os Estados Unidos, a Espanha e a França se enquadram como de baixo consumo *per capita*, com menos de 10 kg/hab/ano (ICEPA, 2012).

Na safra 2011/12 o Brasil teve uma produção de 11.453 mil toneladas de arroz, sendo os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina os maiores produtores, responsáveis por 67 % e 9,6 % da produção nacional, respectivamente (ICEPA, 2012).

Apesar da importância econômica do arroz e do potencial de expansão da cultura no país, o Brasil não é auto-suficiente na sua produção, sendo que cerca de 1.000.000 toneladas de arroz têm sido importadas anualmente. Isto representa cerca de 10% da produção atual brasileira, o que acentua a necessidade de tornar o país auto-suficiente na produção de arroz.

O atual cenário da orizicultura nacional remete a necessidade de incrementos em produtividade de arroz, principalmente devido ao crescimento da população mundial e ao fato de que existe restrições

quanto a expansão da área do sistema de produção orizícola, geralmente fundamentada em impactos ambientais negativos.

Obviamente que o emprego de cultivares melhoradas é fator decisivo e fundamental para o aumento da produtividade (e produção), melhoria da qualidade e dos aspectos agronômicos da cultura. Supor que isso possa ser feito, sem o decisivo e contínuo apoio do melhoramento genético, é ignorar os fatores históricos, que mostram claramente a importância fundamental desta ciência na agricultura dos últimos 50 anos (BAENZIGER et al, 2006).

Arroz

O arroz pertence ao gênero *Oryza* L., família Poaceae (Gramineae). O gênero compreende cerca de 25 espécies, entre as quais 23 são silvestres e apenas duas são cultivadas: *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* Steud (Tabela 1).

A domesticação das espécies silvestres de arroz começou provavelmente há 8.000 anos, sendo primeiramente cultivada no sudeste da Ásia, na Índia e na China (PEREIRA, 2002). Inicialmente, o arroz foi cultivado em solo sem inundação. Foi na China que o processo de alagamento do solo e transplântio de plântulas foi aperfeiçoado, o que tornou o arroz plenamente domesticado (KHUSH, 1997). Não se sabe ao certo onde se originou a espécie *Oryza sativa*, embora existam evidências de que o seu centro de origem seja o sudeste asiático, mais precisamente a região que fica entre a Índia e Myanmar (ANGLADETTE, 1969 e GRIST, 1978) onde a espécie silvestre *Oryza rufipogon*, ancestral de *O. sativa* L., encontra-se em abundância (GONZÁLES, 1985). De acordo com trabalhos de Vavilov, o centro de origem de *O. sativa* é a região situada ao sudeste do Himalaia, apesar de as regiões de Madras, na Índia, e Orissa, nas Filipinas, poderem também ser apontadas como centros primários ou secundários da espécie (GALLI, 1978). Contudo, Nova Guiné é reconhecida como tendo maior diversidade do gênero *Oryza* (VAUGHAN et al., 2005; VAUGHAN et al., 2007).

A partir da Ásia, o arroz foi introduzido, na forma de cultivo sequeiro, na Grécia em 324 a.C., e posteriormente, na Europa, onde somente no século XV passou a ser cultivado em maior escala

(KHUSH, 1997). Foi no final do século XV que o arroz foi introduzido na América Central e Sul. Alguns autores contam inclusive, que teria sido Cristóvão Colombo o primeiro a trazer algumas sementes de arroz para o Novo Mundo (PEREIRA, 2002). Há indícios que a ação de pássaros também deve ter contribuído para a dispersão da espécie no Novo Mundo (VAUGHAN et al., 2005).

De acordo com o processo evolutivo e de domesticação a que se submeteu a espécie *O. sativa* L. ao longo do tempo, foram surgindo inúmeros tipos geneticamente divergentes, os quais foram se adaptando às mais variadas condições agroecológicas. Com base na distribuição geográfica, na morfologia da planta e do grão, em 1928, esta espécie foi dividida em duas principais subespécies, indica e japônica.

O grupo indica (Hsien) é amplamente cultivado em regiões tropicais e sub-tropicais (MIRANDA FILHO e NASS, 2001; WATANABE, 1997). Morfologicamente, caracteriza-se por possuir colmos longos, alta capacidade de perfilhamento, folhas longas e decumbentes e ciclo longo, grãos longos e finos, e mostra-se mais adaptada ao sistema irrigado.

O grupo japônica (Keng) é o grupo varietal mais largamente cultivado nas zonas temperadas (Nordeste e leste da China, Japão e Coreia) (MIRANDA FILHO e NASS, 2001; WATANABE, 1997). Caracteriza-se por apresentar colmos curtos e rígidos, pouca capacidade de perfilhamento, folhas estreitas de cor verde escura, grãos curtos e espessos, e ciclo curto.

De acordo com Zeng et al. (2007) Yunnan na China é o centro de diferenciação genética entre as subespécies indica e japônica.

Existe ainda um terceiro grupo chamado de javanica, que segundo Pereira (2002), parece ter sido produto de seleção efetivada no grupo indica encontrado principalmente na Indonésia.

Tabela 1. Região de origem, número de cromossomos e tipo de genoma das espécies do gênero *Oryza*.

Espécie	Região de origem	Nº de cromossomos	Genoma
Grupo <i>Oryza sativa</i>			
<i>O. sativa</i> L.	Ásia	24	AA
<i>O. barthii</i>	África	24	AA
<i>O. glumaepatula</i>	América	24	AA
<i>O. breviligulata</i>	África	24	AA
<i>O. glaberrima</i>	África	24	AA
<i>O. perennis</i>	Ásia	24	AA
<i>O. longistaminata</i>	África	24	AA
<i>O. meridionalis</i>	Oceania	24	AA
<i>O. nivara</i>	Ásia	24	AA
<i>O. rufipogon</i>	Ásia	24	AA
Grupo <i>Oryza officinalis</i>			
<i>O. punctata</i>	África	48	BBCC
<i>O. minuta</i>	Ásia	48	BBCC
<i>O. eichingeri</i>	África	24	CC
<i>O. officinalis</i>	Ásia	24	CC
<i>O. rhizomatis</i>	Ásia	24	CC
<i>O. alta</i>	América	48	CCDD
<i>O. glandiglumis</i>	América	48	CCDD
<i>O. latifolia</i>	América	48	CCDD
<i>O. australiensis</i>	Oceania	24	EE
<i>O. brachyantha</i>	África	24	FF
Grupo <i>Oryza granulata</i>			
<i>O. granulata</i>	Ásia	24	GG
<i>O. meyeriana</i>	Ásia	24	GG
Grupo <i>Oryza ridleyi</i>			
<i>O. longiglumis</i>	Ásia	48	HHJJ
<i>O. ridleyi</i>	Ásia	48	HHJJ
<i>O. schlechteri</i> *	Ásia	*	*

*Genoma desconhecido.

Fonte: VAUGHAN e MORISHIMA (2003); GONZALÉS (1985)

Genoma do arroz

O arroz é considerado a espécie modelo para estudos em monocotiledôneas, em paralelo com *Arabidopsis* para dicotiledôneas, por ser uma espécie diplóide com o genoma relativamente pequeno (430 Mpb). O genoma de arroz é o menor entre as gramíneas de grande importância econômica, como o sorgo, milho, aveia, cevada e trigo (ARUMUNAGATHAN & EARLE, 1991), tornando-se referência para mapeamento comparativo em gramíneas pela elevada sintonia genômica com outras monocotiledôneas (MOORE *et al.*, 1995). O arroz foi a primeira espécie vegetal de importância agrícola a ter o genoma inteiramente seqüenciado, com um número estimado de 46 a 56 mil genes para a subespécie *indica*, e de 32 a 50 mil genes para a subespécie *japônica* (GOFF *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2002).

O genoma do arroz apresenta blocos ordenados de genes conservados em relação às outras gramíneas (MOOR *et al.*, 1995), o que significa que a informação sobre o controle genético de uma característica de arroz pode ser relevante para o controle genético de uma característica similar em alguma outra gramínea. É esperado que a genômica funcional de plantas modelo, como o arroz, possa contribuir para o entendimento da base biológica, bem como da exploração da informação genômica para o desenvolvimento das culturas (XU, 2005). As informações geradas no genoma do arroz podem ser acessadas em bancos de dados conservados e disponibilizados por diferentes países, garantindo avanços significativos na pesquisa genética da espécie.

O estudo revelou que 42,2% do genoma *indica* é formado por seqüências repetidas, sendo a seqüência GC mais freqüente. Os autores detectaram ainda que 49,4% do genoma do arroz *indica* é homólogo a *Arabidopsis thaliana*. O sequenciamento do genoma da subespécie japônica revelou a existência de alta homologia com outros cereais (GOFF *et al.*, 2002).

Melhoramento genético de arroz

Historicamente, o melhoramento genético de arroz é dividido em duas fases, anterior e posterior à Revolução Verde. Anterior a década de 60, quando aconteceu a Revolução Verde, o cultivo era feito

com cultivares de tipo Tradicional de arroz. Estas são mais adaptadas ao sistema de sequeiro e caracterizam-se por apresentar ciclo vegetativo menor, pouca capacidade de perfilhamento, raízes longas e espessas, panículas longas, resistentes ao degrane, grãos longos e espessos, folhas e glumas glabras.

Na década de 60 surgiu o conceito de variedade moderna de arroz, ou seja, variedades contrastantes agronomicamente com relação às tradicionais. As principais características que diferem as variedades modernas das tradicionais são: porte baixo, alto potencial em perfilhamento, folhas largas e eretas, raízes em maior número e mais finas, ciclo longo, panículas longas e grãos longos e finos, características estas que representaram grande avanço em produtividade. A primeira cultivar moderna foi lançada pelo IRRI, chamada de IR-8, uma cultivar semi-anã, a qual elevou abruptamente a produtividade (RANGEL et al., 1996). Por esta razão, foi extensivamente utilizada como genitor em programas de melhoramento no mundo todo, dando origem a outras cultivares de arroz de tipo moderno.

Este cenário causou grande impacto positivo, porém ao mesmo tempo contribuiu para o estreitamento da base genética de arroz em cultivo, condição que pode levar à vulnerabilidade genética. Além disso, a estreita base genética é tradicionalmente apontada como sendo a principal razão para a estagnação dos ganhos genéticos nos programas de melhoramento de arroz no Brasil e no mundo (RANGEL et al., 1996; RANGEL et al., 2006; VIEIRA, 2007).

Alguns autores apontam que as estimativas de ganho de produtividade em arroz podem ser consideradas baixas, entre 1,3% ao ano (SOARES et al., 1994; BRESEGHELLO et al., 1999; ATROCH e NUNES, 2000). Para o Rio Grande do Sul, Lopes et al. (2005) estimaram ganhos de 0,8% ao ano, tendo como referência o período de 1979 – 2004, e Moura Neto et al. (2009, 2011) falam em 0,94% a 2,2% ao ano no período de 1979 – 2010. Marschalek et al. (2013) ressaltam que em Santa Catarina o incremento em produtividade foi de 2,25% para o período de 1957 até 2013. Uma das justificativas para o baixo ganho genético em produtividade se deve ao fato de que as linhagens que são avaliadas nos ensaios finais têm a base genética muito semelhante à das cultivares recomendadas (BRESEGHELLO et al., 1999).

Para Breseghello et al. (1999) um componente do melhoramento de que o pesquisador não deve descuidar-se é a base

genética das linhagens que estão sendo produzidas pelo seu programa, sendo que, a semelhança genética entre cultivares de qualquer cultura é um fator de risco em relação aos estresses bióticos, principalmente doenças.

Melhoramento genético de arroz em Santa Catarina

Santa Catarina (95.346,181 km²) é um Estado eminentemente agrícola que, embora ocupe apenas 1,12% do território nacional, dos quais apenas 12% são agricultáveis, contribui com 9,6% da produção orizícola brasileira (ICEPA, 2012).

O arroz irrigado em Santa Catarina é cultivado em aproximadamente 149 mil hectares (ICEPA, 2012), distribuídos em mais de doze mil propriedades rurais envolvendo oito mil produtores, na faixa litorânea Norte e Sul, e no Vale do Itajaí.

O sistema de cultivo catarinense preponderante é o irrigado com sementes pré-germinadas, que absorve 83% da área de arroz do Estado. O pré germinado foi introduzido pelos imigrantes italianos no Vale do Itajaí, no começo do século XX. Prosperou, provavelmente, em decorrência do próprio ambiente da região, caracterizado pela predominância de solos argilosos mal drenados e pela inexistência de uma estação seca, o que dificultava o preparo convencional do solo (EPAGRI, 2002).

Até 1985 Santa Catarina importava sementes de arroz de São Paulo e do Rio Grande de Sul. Após 1985, o Estado tornou-se exportador de sementes deste cereal, exportando sementes para os estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso, além de outros países da América Latina como Argentina e Bolívia (MARSCHALEK et al., 2008). Isso se deve em grande parte ao trabalho de melhoramento genético com o desenvolvimento de cultivares de arroz com desempenho agrônômico superior as cultivares plantadas na época (MARSCHALEK et al., 2013)

Em Santa Catarina, o trabalho de pesquisa e melhoramento genético do arroz é desenvolvido pela Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) na Estação Experimental de Itajaí (EEI).

A Epagri-EEI já lançou 20 cultivares de arroz irrigado, todas

pertencentes à subespécie indica (Tabela 2). Entre estas, 12 são oriundas de introdução de linhagens, provenientes do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), International Rice Research Institute (IRRI), Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Instituto Rio Grandense do Arroz (Irga) e Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão (Embrapa-CNPAP); cinco são descendentes de hibridação controlada feita na Epagri-EEI; uma de seleção recorrente (intercruzamento de 10 variedades de arroz), e duas oriundas de mutação induzida. Até 1990 predominava na Epagri-EEI a utilização de introdução de linhagens para obtenção de cultivares. Atualmente, a hibridação controlada e a mutação induzida são as ferramentas mais utilizadas no desenvolvimento de novas cultivares, sendo que a hibridação é responsável por 80% das linhagens geradas (VIEIRA, et al., 2007).

Tabela 2. Cultivares de arroz irrigado desenvolvidas e lançadas pela Epagri.

Cultivar	Ano de lançamento	Método de obtenção
Empasc 100	1980	Introdução
Empasc 101	1980	Introdução
Empasc 102	1980	Introdução
Empasc 103	1981	Introdução
Empasc 104	1985	Introdução
Empasc 105	1987	Introdução
Epagri 106	1992	Introdução
Epagri 107	1994	Introdução
Epagri 108	1995	Introdução
Epagri 109	1996	Introdução
SCS BRS 111	2000	Introdução
SCS 112	2000	Hibridação
SCSBRS Tio Taka	2002	Seleção Recorrente
SCS 114 Andosan	2005	Mutação induzida
SCS 115 CL	2007	Hibridação
SCS 116 Satoru	2009	Hibridação
SCS117 CL	2011	Hibridação
SCS118 Marques	2013	Mutação induzida
SCS119 Rubi	2013	Introdução
SCS120 Ônix	2013	Hibridação

O melhoramento genético para a cultura do arroz em Santa

Catarina foi e ainda é uma ciência crucial ao sucesso de toda a cadeia produtiva. No entanto, atualmente, depara-se com índices de ganho em produtividade pequenos e constantes, o que é um cenário preocupante, haja vista a crescente demanda por este alimento.

Na busca por maiores avanços em produtividade e qualidade, os melhoristas buscam fontes para tolerância a estresses bióticos e abióticos, fontes para aumentar a qualidade de grãos e características outras que contribuam principalmente com os componentes de rendimento (panícula por planta, grãos por panícula, tamanho de panícula). Segundo Vaughan et al. (2007), o futuro do melhoramento de plantas será a continuidade em mudanças na arquitetura, metabolismo e fisiologia das plantas cultivadas.

Nesse sentido, é necessário um esforço maior para que as novas variedades criadas possam agregar caracteres de interesse agrônomo a uma base genética menos restrita.

A variabilidade genética almejada no melhoramento genético está disponível nos bancos de germoplasma e em alelos originados por mutação. A mutação é a única forma de criar variabilidade genética, constituindo-se por isso no combustível básico para a seleção natural e sua força evolutiva. A mutação é uma ferramenta vital para evolução das espécies e também para trabalhos de melhoramento genético, tendo em vista a grande demanda futura por alimento decorrente do aumento populacional.

Mutação e a Estrutura floral do arroz

A mutação é um dos fatores evolutivos capaz de criar variabilidade genética. É definida como alterações herdáveis na sequência de nucleotídeos ou na estrutura e número de cromossomos. Pode ser causada por erros de replicação do DNA ou alterações por deleção, duplicação ou rearranjos causados por vírus, transposons, ação enzimática ou processos físicos e químicos (FUTUYMA, 2013). A mutação ocorre espontaneamente e pode também ser induzida através de agentes mutagênicos físicos e químicos (MONTÁLVAN, 1999).

A frequência da mutação natural é muito baixa, sendo estimado que ela ocorra em cada loco gênico a cada milhão de gametas, ou seja, numa frequência de $1:10^6$. Deve-se salientar que a mutação, induzida ou

natural, ocorre de forma aleatória e, na maioria das vezes dá-se o surgimento de alelos deletérios em altas taxas, o que resulta em indivíduos geralmente menos vigorosos. No entanto, vale enfatizar as mutações em genes relacionados com características agronômicas importantes que facilitaram o processo de domesticação das espécies cultivadas. No caso do arroz, um bom exemplo é a mutação em apenas um par de bases no DNA que causou a mudança em um aminoácido, resultando na redução do degrane natural nesta espécie (LI et al., 2006; KONISHI, et al., 2006).

A estrutura floral do arroz é do tipo inflorescência, com flores perfeitas (hermafrodita), sendo autógama quanto ao modo de reprodução (autopoliniza-se) (COFFMANN e HERRERA, 1980). Sem dúvida, eventuais alterações na estrutura floral do arroz poderiam trazer respostas diretas ao incremento em produtividade. Alterações desse tipo seriam através de mutação.

Muitas das alterações nas estruturas florais das plantas são decorrentes de mutações homeóticas, que ocorrem espontaneamente (FOSKET, 1994; ZHENG, et al., 2003). As duas plantas tidas como modelo para esse tipo de estudo são as espécies *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus*.

Os genes homeóticos codificam fatores de transcrição que determinam tecidos e órgãos vegetativos e reprodutivos (FOSKET, 1994). Esses genes impõem o programa para determinar a diferenciação única de cada segmento. Parte deles atuam produzindo fatores de transcrição, que ativarão outros genes homeóticos, e, dessa forma, pode haver uma série de consequências fenotípicas provocadas por uma mutação em alguns destes genes.

Em arroz muitos genes que controlam a estrutura floral já foram clonados. No entanto, poucos trabalhos tratam destes genes como mutantes homeóticos (ZHENG, et al., 2003). Um exemplo de mutação na inflorescência do arroz é a característica espiguetas agrupadas.

Característica espiguetas agrupadas

A característica espiguetas agrupadas foi inédita e originalmente relatada no Brasil pelo Dr. Satoru Yokoyama (in Memoriam) pesquisador da Epagri-EEI, em 1997. Esta característica é oriunda de

mutação natural ocorrida em um único perfilho de uma planta do acesso “Amaghad” (YOKOYAMA et al., 1999). As plantas com esta característica possuem a estrutura da inflorescência alterada, caracterizando-se por apresentar 2 a 5 espiguetas agrupadas em cada nó do ráquis, enquanto plantas normais tem somente uma espiguetas. Isso altera consideravelmente um dos componentes de rendimento (número de grãos por panícula) e pode assim significar uma possibilidade real de aumento da produtividade no arroz.

Sementes deste perfilho Amaghad foram colhidos e cultivados na safra seguinte, o que resultou em uma população de aproximadamente 70 plantas completamente estabilizadas geneticamente com panículas cujas espiguetas foram bastante agrupadas (Figura 1). Este acesso foi nomeado a partir de então como Multiespigueta.

Além de possuir a característica espiguetas agrupadas, o Multiespigueta é caracterizado como planta de tipo tradicional, com algumas características importantes ao melhoramento como alta capacidade de perfilhamento e colmos espessos. No entanto, também apresenta características indesejáveis como estatura de planta muito elevada (163 cm), grãos de pericarpo vermelho, grãos curtos e espessos, suscetibilidade a brusone e ciclo extremamente longo (VIEIRA, 2007).



Figura 1. Característica espiguetas agrupadas em panícula do acesso Multiespigueta.

Em 2006, a característica também foi verificada no município de Formoso do Araguaia, Tocantins, pela Embrapa-CNPAF, e foi denominada de CNA 10928 (DURÃO, 2008). Este acesso possui as espiguetas agrupadas no mesmo nó do ráquis assim como o acesso Multiespigueta da Epagri. No entanto, morfológicamente, caracteriza-se por ser uma planta de tipo moderno. Segundo Durão (2008), a CNA 10928 pertence a sub-espécie indica.

Existem evidências de que a característica espiguetas agrupadas é governada por poucos genes e de que a interação alélica é de dominância ou co-dominância (YOKOYAMA et al., 1999; DURÃO, 2008). No trabalho de Durão (2008), a característica foi localizada na região flanqueada pelo locus RM6446 e RM20330 no cromossomo 6.

Além do Brasil, esta característica também foi encontrada na China e no Estados Unidos (ZHENG et al., 2003) e em ambos os casos, a característica também foi localizada no cromossomo 6.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar as bases genéticas da característica espiguetas agrupadas em arroz (*Oryza sativa* L.).

Objetivos específicos

- ✓ Estimar o número de genes e possíveis interações alélicas envolvidas com a característica espiguetas agrupadas;
- ✓ Avaliar o efeito da característica espiguetas agrupadas no rendimento de grãos e nos componentes de rendimentos em linhas endogâmicas recombinantes;
- ✓ Testar os marcadores SSR RM6446 e RM20330 para caracterizar o fenótipo espiguetas agrupadas em arroz.
- ✓ Avaliar o efeito de deriva de glifosato como indutor da característica espiguetas agrupadas em arroz.

CAPÍTULO I

Análise genética da característica espiguetas agrupadas em arroz

RESUMO – A característica espiguetas agrupadas em arroz (*Oryza sativa* L.) apresenta de duas a seis espiguetas agrupadas no mesmo nó do raquis da panícula, enquanto que uma panícula normal tem apenas uma espiguetas. Os mecanismos genéticos que controlam a expressão da característica ainda não são bem conhecidos. O objetivo do presente trabalho foi estimar o número de genes e a ação gênica, bem como as possíveis interações alélicas envolvidas com a característica espiguetas agrupadas em arroz. Os dados foram obtidos a partir das gerações F₁, F₂ e F₁RC₁ oriundas de dois cruzamentos: SC 339 com Multiespigueta, e, SCSBRS TioTaka com Multiespigueta, e os recíprocos. O trabalho foi desenvolvido na Epagri – Estação Experimental de Itajaí, Itajaí, SC. A comprovação de hipóteses foi baseada no teste de qui-quadrado. Os resultados mostram que a característica espiguetas agrupadas é qualitativa, sendo que o gene da mutação sofre efeito de epistasia de um segundo gene, ambos ligados em repulsão por 30 cM, e a interação alélica é de co-dominância.

ABSTRACT – The clustered spikelets trait has two to six spikelets clustered under the same node of the rachis, whereas simple panicle has only one spikelets. The genetic mechanisms that control the expression of the trait are not yet well known. The aim of this study was to estimate the number of genes and gene action, as well as the possible allelic interactions involved with the characteristic clustered spikelets into rice (*Oryza sativa* L.). The results were obtained from F₁, F₂ e F₁RC₁ generations, from two crossing: SC 339 x Multiespigueta and SCSBRS TioTaka x Multiespigueta, including reciprocal crosses. The work was developed in Epagri - Experimental Station of Itajai, Itajaí, SC, Brazil. The hypotheses were confirmed by the chi-square. The results show that the characteristic clustered spikelets is qualitative, and the gene mutation suffer epistatic effect of a second gene, both linked in repulsion by 30 cM, and the allelic interaction is co-dominance.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das espécies agrícolas de grande importância social e econômica não apenas para o Brasil, mas também em nível mundial. No Brasil, os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina são responsáveis por mais da metade da produção nacional, sendo referência também em produtividade. Em Santa Catarina, por exemplo, em 1970 a produtividade era de 2,0 t/ha, e atualmente a média estadual é de aproximadamente 7,0 t/ha, sendo que em algumas regiões do Alto Vale do Rio Itajaí a produtividade chega a 12 t/ha (MARSCHALEK et al., 2008). No entanto, a produtividade de arroz em Santa Catarina está estagnada desde 2003 com 7,0 /ha (Figura 2). Para os avanços em produtividade de arroz foram e são determinantes as atividades de melhoramento genético com o desenvolvimento de cultivares superiores.

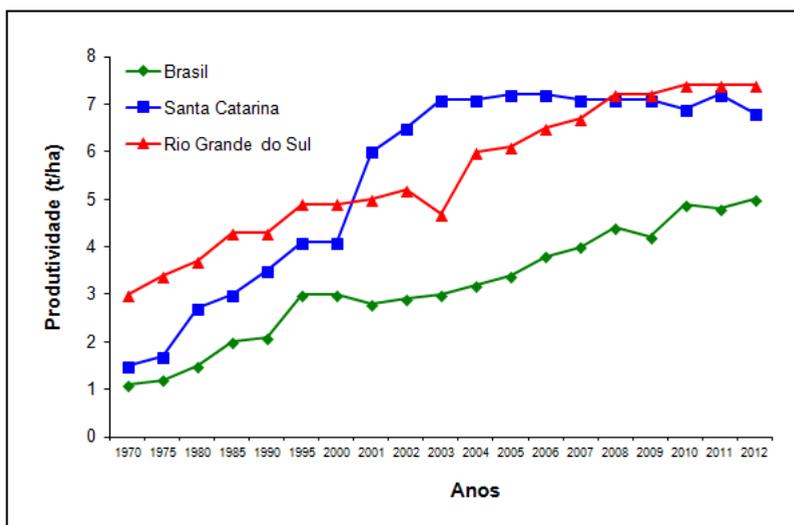


Figura 2. Evolução da produtividade de arroz em Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Brasil, de 1970 a 2012.

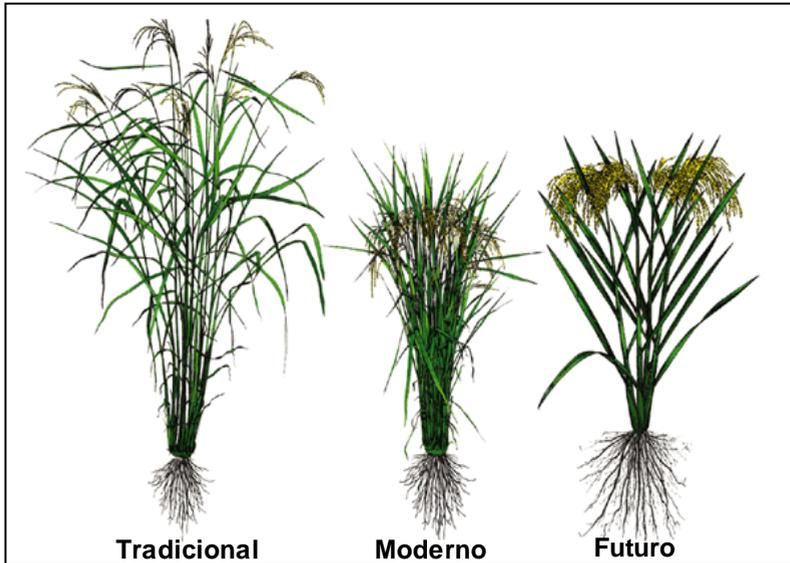
A produtividade é uma característica bastante influenciada por outros fenótipos, os quais são denominados de componentes do rendimento, sendo eles: esterilidade, panículas por planta, tamanho de panícula, grãos por panícula e peso de mil grãos. O número de grãos por panícula é uma característica vital para produtividade de arroz, sendo de herança quantitativa, tem alta herdabilidade (85,6%), e sofre alterações ambientais e epistáticas (LIU et al., 2011; HUANG et al., 2009).

A esterilidade e o peso de mil grãos são características já bem estabelecidas nas cultivares melhoradas. Em cultivares de arroz irrigado para o sistema pré-germinado por exemplo, as cultivares possuem esterilidade natural próximo a 15% e o peso de mil grãos variando de 26 a 32 g. O tamanho de panícula das cultivares atualmente plantadas são consideradas interessantes variando de 20 a 25 cm (VIEIRA, 2007).

As características número de panículas por planta e grãos por panícula são promissoras ao melhoramento genético. Existem ideotipos de plantas que o melhoramento genético muitas vezes se baseia. Até a Revolução Verde a cultura do arroz plantava cultivares de tipo tradicional, e a partir deste período, os orizicultores foram agraciados com o tipo moderno com cultivares de estatura menor e maior número de panículas por planta (Figura 3). Ainda busca-se o tipo futuro com menos panículas por planta mas, panículas com maior número de grãos. No entanto, vale ressaltar, para que a planta tenha capacidade de atribuir grandes panículas e portanto, com muito mais grãos, é importante altas taxas fotossintéticas para que a planta possa ter energia para desenvolver este novo perfil de planta e encher todos os grãos, sendo necessário para isso muito mais área foliar do que apresenta a ilustração da figura 3.

Na busca pelo tipo *futuro*, muitos programas de melhoramento genético trabalham com a característica panícula compacta a qual agrega muitos grãos por panícula. No entanto, até então, não se conseguiu nenhum avanço quanto ao desenvolvimento de cultivares de grande volume em produtividade com esta característica.

Existem muitos QTLs que estão envolvidos no número de grãos por panícula, entre os quais o GN1 que codifica a citocinina oxidase e, portanto, o teor endógeno de citocinina; OsSPL14 que promove maior número de ramificações e DEP1 que aumenta o número de grãos por panícula e reduz o comprimento do interno da inflorescência (HUANG et al., 2009).



Fonte: Khush, 1995.

Figura 3. Tipos de cultivares de arroz.

Em 1997, foi descoberto na Epagri-EEI, Itajaí, SC, a característica espiguetas agrupadas em arroz, no acesso Multiespigueta (YOKOYAMA, 1997). Em 2006, esta mesma característica também foi evidenciada em Formoso do Araguaia, TO, pela Embrapa-CNPAP, com o acesso CNA 10928 (DURÃO, 2008). Além do Brasil, a característica também foi observada na China (ZHENG, et al., 2003).

A característica espiguetas agrupadas apresenta grãos agrupados no mesmo nó do raquis da panícula enquanto uma variedade normal tem apenas uma espiguetas. Desta forma, a característica pode contribuir com o aumento de grãos por panícula, e com isso, promover maior rendimento. Para que o melhoramento genético possa explorar de maneira eficiente esta característica, é indispensável o conhecimento sobre os mecanismos genéticos envolvidos, os quais são pouco conhecidos na característica em questão.

O objetivo deste trabalho foi estimar o número de genes e as possíveis interações alélicas envolvidas com a característica espiguetas agrupadas em arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Epagri – Estação Experimental de Itajaí, Itajaí, SC. Foram desenvolvidas e avaliadas três gerações (F_1 , F_2 e F_1RC_1) oriundas de dois cruzamentos: SC 339 x Multiespigueta e SCSBRS TioTaka x Multiespigueta, contando também com os respectivos recíprocos.

A cultivar SCSBRS TioTaka e a linhagem SC 339 são de tipo moderno, com bom perfilhamento, grãos longo fino de pericarpo branco, ambas com altura média ideal (99 e 100 cm, respectivamente), ciclo longo (141 dias e 136 dias até a maturação, respectivamente) e panículas de tipo normal. O acesso Multiespigueta é uma planta de tipo tradicional, possui excelente perfilhamento, grãos curtos de pericarpo vermelho, altura média de 163 cm, ciclo super longo (188 dias até a floração) e com panículas do tipo espiguetas agrupadas (Figuras 4 e 5).

Os cruzamentos foram realizados na safra 2008/09. Como o arroz possui flores perfeitas (hermafrodita), sendo autógama quanto ao modo de reprodução (autopoliniza-se) (COFFMANN & HERRERA, 1980), os cruzamentos foram realizados iniciando com a emasculação das flores seguindo com a polinização. A emasculação consistiu em retirar os estames das espiguetas no estágio anterior à antese. Isso é feito cortando-se a espigueta no seu terço superior e com auxílio de um sistema de vácuo produzido por moto-bomba, os estames foram aspirados através de uma agulha hipodérmica acoplada a uma mangueira. A polinização consistiu em promover o contato de grãos de pólen da antera com o estigma, sendo para isso, necessário que as flores estivessem abertas para liberar o pólen (VIEIRA et al., 2007). A abertura das flores do arroz, em condições naturais, pode durar até 2h por dia (COFFMANN & HERRERA, 1980), e ocorre entre 11h e 14h sob condições de temperaturas ideais (25°C – 30°C). O pólen é liberado no momento da antese e mantém-se viável por cinco minutos após sua liberação, ao passo que o estigma se mantém fértil por até cinco dias (COFFMANN & HERRERA, 1980).

No momento de abertura das flores, as panículas emasculadas foram colocadas próximas ao genitor masculino, onde se movimentou cuidadosamente as panículas deste sobre as panículas do genitor feminino a fim de promover a polinização. As sementes obtidas foram coletadas 30 dias após a polinização e armazenadas em câmara fria até a próxima safra para avaliação da geração F_1 .

Na safra 2009/10 as sementes F_1 foram plantadas em caixas de madeira com solo e no estádio de 3 a 4 folhas as plântulas obtidas foram transplantadas manualmente na lavoura. O sistema de cultivo foi de acordo com a tecnologia preconizada pela Epagri (EBERHARDT et al., 2012).

Com o F_1 de Multiespigueta x SC 339 foi constituída uma população F_1RC_1 , sendo a linhagem SC 339 o genitor recorrente. Na geração F_1 as plantas foram colhidas na forma de bulk, as quais formaram a geração F_2 na safra 2010/11, onde também foi plantado o F_1RC_1 , sendo as plantas colhidas individualmente. O sistema de cultivo das gerações F_2 e F_1RC_1 foi o mesmo adotado para a F_1 .

Juntamente com as famílias segregantes foram plantadas quatro testemunhas: SCSBRS TioTaka, SC 339, CNA 10928 e Multiespigueta.

Também foi avaliada a estabilidade genética de populações F_5 , F_6 e F_7 dos respectivos cruzamentos.

Como não existem informações suficientes na literatura a respeito dos detalhes da característica espiguetas agrupadas, a fenotipagem das plantas foi feita com base em uma escala de descritores que varia de 1 a 4 (Tabela 3 e Figura 6).

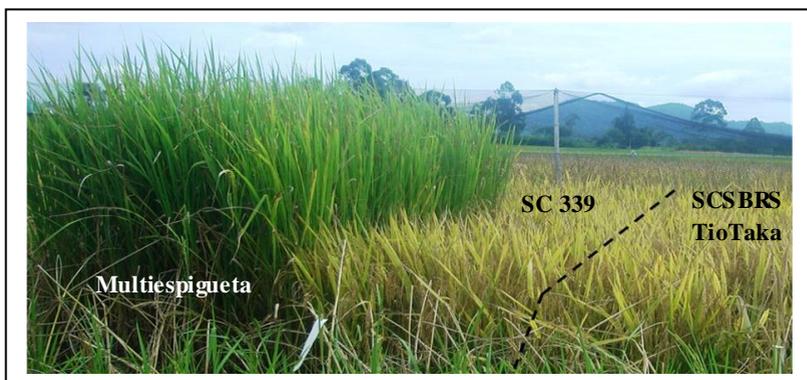


Figura 4. Genitores utilizados para obtenção de populações segregantes.

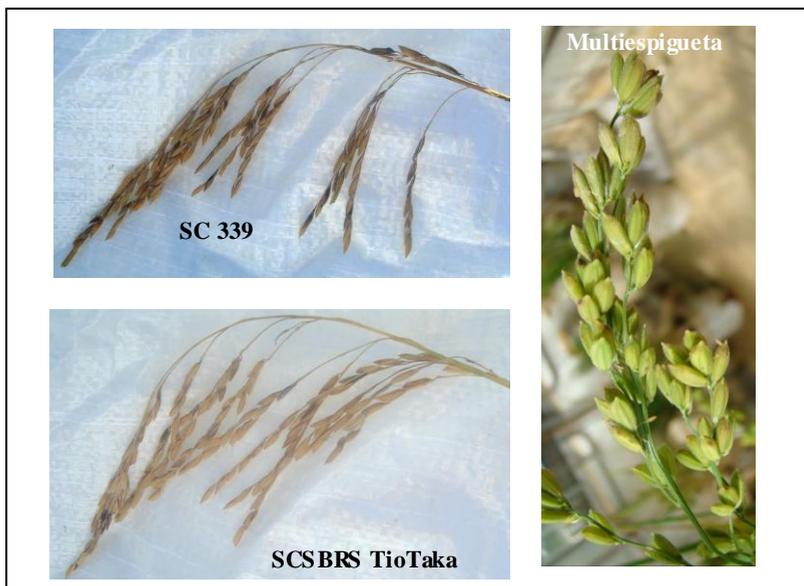


Figura 5. Panícula dos genitores SCSBRS TioTaka, SC 339 e Multiespigueta.

Tabela 3. Descritores para característica espiguetas agrupadas em arroz (MARSCHALEK e VIEIRA, dados não publicados).

Nota	Fenótipo
1	Panícula com 95-100% das espiguetas agrupadas
2	Ramificações da panícula com 3 grãos agrupados no ápice, seguidos de 3 ou 4 grãos simples e novamente 3 grãos agrupados
3	Ramificações da panícula com apenas 2 grãos agrupados no ápice
4	Panícula sem agrupamento das espiguetas (simples)



Figura 6. Descritores para característica espiguetas agrupadas.

Foi estimado o número de genes e possíveis interações alélicas a partir do teste de escala em conjunto, comparando as médias observadas com as esperadas pelo teste de qui-quadrado a partir das gerações F_1 , F_1RC_1 e F_2 . Para isso foram testadas duas hipóteses:

1. Mutação controlada por apenas um gene;
2. Mutação controlada por dois genes.

Para comprovação da possível hipótese, linhagens F_7 , estabilizadas geneticamente para diferentes graus de agrupamento da espiguetas, foram cruzadas na forma de um dialelo parcial e avaliados de acordo com o modelo 4 de Griffing (1956).

Os cruzamentos dialélicos foram realizados na safra 2009/10, cujas sementes formaram a geração F_1 na safra seguinte. Sementes das plantas F_1 foram colhidas na forma de bulk, cujas sementes formaram a geração F_2 na safra 2011/12. As parcelas F_2 foram formadas de 223 a 434 plantas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas quatro populações F_1 (Tabela 4) todas as plantas de todos os cruzamentos apresentaram panículas com fenótipo intermediário aos genitores, com panículas tipo 3 e expressividade variável na panícula mas não entre plantas.

Todas as plantas F₁ floresceram com 209 dias desde a semeadura, tiveram elevada estatura e grãos curtos e vermelhos, semelhantes ao genitor Multiespigueta (Figura 7).

Tabela 4. Características fenotípicas de populações F₁ oriundas dos cruzamentos entre Multiespigueta x SC 339 e Multiespigueta x SCSBRS TioTaka, e seus recíprocos.

Cruzamento	Nº de plantas	Altura (cm)¹	Tipo de Panícula²	Cor endosperma	Forma do grão
SC 339 x ME ³	24	138	3	Vermelho	Curto
ME x SC 339	8	140	3	Vermelho	Curto
SCSBRS TioTaka x ME	65	152	3	Vermelho	Curto
ME x SCSBRS Tio Taka	50	160	3	Vermelho	Curto
Genitores					
Multiespigueta		163	1	Vermelho	Curto
SC 339		100	4	Branco	Longo
SCSBRS TioTaka		99	4	Branco	Longo

¹ Média de todas as plantas; ² De acordo com a tabela 3 e figura 6. ³ ME = Multiespigueta.



Figura 7. Fenótipo das plantas F₁.

Como não houve diferença na expressão da característica nos diferentes cruzamentos, principalmente nos recíprocos, fica evidente que o caráter em estudo não é controlado por herança materna e nem mesmo é influenciado pelos diferentes genitores. Esta inferência foi baseada no fato de que independente de quem é o genitor masculino ou feminino, o fenótipo da F_1 resultante sempre foi o mesmo, e portanto, tratando-se de gene (s) nuclear (es).

Na população F_1RC_1 , como era esperado, houve segregação para distintos fenótipos do caráter, no entanto, não houve a presença de plantas com panícula tipo 1. Do total de 73 plantas, 33 apresentaram panículas tipo 4 (simples), 28 panículas tipo 3 e 12 do tipo 2.

O tamanho das populações F_2 variou de 156 a 248 plantas (Tabela 5), e foi observado a frequência de 4/16 para panículas tipo 4, 6/16 para tipo 3, 5/16 para o tipo 2, e 1/16 para o tipo 1. O padrão de segregação foi o mesmo para os cruzamentos recíprocos e também para os cruzamentos envolvendo diferentes genitores (SC 339 e SCSBRS TioTaka). A consistência da segregação está no fato de que não houve desvios significativos entre as proporções dos distintos fenótipos mutantes obtidas de cruzamentos e seus recíprocos. Portanto, como verificado na geração F_1 , os dados da F_2 também indicam que não há efeito materno no controle da característica em questão.

Parte das plantas F_2 foram colhidas com 170 dias desde a semeadura, e outra parte colhida com 254 dias. A maioria das plantas colhidas com 170 dias tiveram panículas do tipo 4 (aproximadamente 90%) e tipo 3. daquelas colhidas com 254 dias, 95% das plantas tinham panícula tipo 1 e 2, com poucas plantas do tipo 3 e 4. Segundo Liu et al. (2011), QTLs para número de grãos por panícula podem estar associados a QTLs que controlam ciclo. Vale ressaltar, que o número de grãos por panícula pode variar por diversos fatores, inclusive com fatores abióticos que ocorram na diferenciação da panícula.

A distribuição de frequência representa a posição intermediária da F_1 , a F_2 mostrou uma distribuição a cerca de todos os tipos de panícula, e a F_1RC_1 concentra-se no genitor recorrente de panículas tipo 4 (Figura 8).

Tabela 5. Segregação na geração F_2 para a característica espiguetas agrupadas em arroz, envolvendo dois cruzamentos e seus recíprocos.

Cruzamentos	Tipo de panícula				Total
	1	2	3	4	
SC 339 x Multiespigueta	28	42	60	49	180
Multiespigueta x SC 339	20	66	106	56	248
Total	48	108	166	105	428
SCSBRS Tio Taka x Multiespigueta	40	54	89	56	239
Multiespigueta x SCSBRS Tio Taka	22	38	50	46	156
Total	62	92	139	102	395

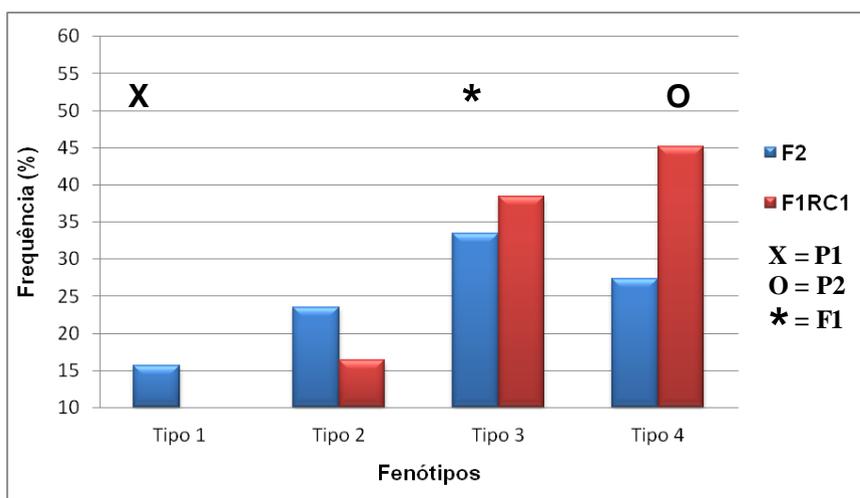


Figura 8. Distribuição de frequência de progênies nas gerações F_1 , F_1RC_1 e F_2 , e dos genitores do cruzamento SC 339 x Multiespigueta.

Testando a primeira hipótese, temos um gene agindo na expressão da característica espiguetas agrupadas. Com base na segregação da geração F_2 , fica evidente o modelo de segregação 3:1 sendo considerado como mutante os tipos 1, 2 e 3, e não mutante o tipo 4. Os tipos 2 e 3 são considerados como heterozigotos. Supondo esta hipótese, sugere-se o genótipo *bb* representando a mutação, e o *BB*

como não mutado, ou seja, o fenótipo tipo 4 (simples) (Figura 9). Desta forma, é esperado que a segregação na F_1RC_1 seja 0:1:1, como de fato foi observado. Na geração F1 todas as plantas foram do tipo 3, portanto, mutantes, o que representa interação alélica de dominância. Pelo teste de qui-quadrado, a segregação observada não difere da esperada, ou seja, a hipótese de um gene envolvido no controle da característica pode ser aceita (Tabela 6).

Este tipo de hipótese é bem fundamentada no fato de que mutações dificilmente ocorrem simultaneamente em dois genes. A domesticação do arroz é um bom exemplo, onde a mutação em apenas um par de bases no DNA causou a mudança em um aminoácido, resultando na redução do degrane natural nesta espécie (LI et al., 2006; KONISHI, et al., 2006). Outra mutação importante foi a deleção do gene *qSW5* causando o aumento na produção de sementes em arroz (SHOMURA et al., 2008).

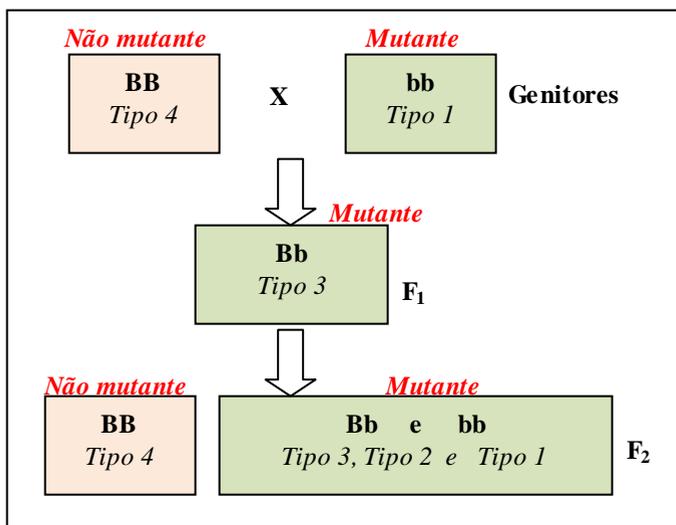


Figura 9. Representação genotípica para a mutação espiguetas agrupadas em arroz, considerando um gene no controle da expressão deste fenótipo.

Tabela 6. Teste X^2 para hipótese de um gene envolvido no controle da característica espiguetas agrupadas, a partir da segregação de progênies F_2 .

Fenótipo	Freq. Obs.	Freq. Esp.	$X^2 = (F_{Obs} - F_{Esp})^2 / F_{Esp}$
SC 339 x Multiespigueta (n = 180)			
Mutante	131	135	0,12
Não mutante (Simples)	49	45	0,36
Σ			0,48
Multiespigueta x SC 339 (n= 248)			
Mutante	192	186	0,19
Não mutante (Simples)	56	62	0,58
Σ			0,39
Combinados (SC 339 x Multiespigueta + Multiespigueta x SC 339) (n = 428)			
Mutante	323	321	0,01
Não mutante (Simples)	105	107	0,04
Σ			0,05
SCSBRs TioTaka x Multiespigueta (n = 239)			
Mutante	183	179	0,09
Não mutante (Simples)	56	60	0,27
Σ			0,18
Multiespigueta x SCSBRs TioTaka (n= 156)			
Mutante	110	117	0,42
Não mutante (Simples)	46	39	1,26
Σ			1,68
Combinados (SCSBRs TioTaka x Multiespigueta) + (Multiespigueta x SCSBRs TioTaka) (n = 395)			
Mutante	293	296	0,03
Não mutante (Simples)	102	99	0,09
Σ			0,12
Combinados (n = 823)			
Mutante	616	617	0,002
Não mutante (Simples)	207	206	0,005
Σ			0,007
$X^2_{tab} = 3,841 (P = 0,05)$			

Aceitando a hipótese de um gene no controle da característica espiguetas agrupadas, é esperado que após muitas gerações de autofecundação tenha-se linhagens estabilizadas em dois fenótipos (tipo 1 e tipo 4). No entanto, ao analisar linhas endogâmicas recombinantes em geração F_7 desses mesmos cruzamentos evidenciam-se genótipos estabilizados geneticamente em três fenótipos: panículas do tipo 1, tipo 2 e tipo 4 (Figura 10).

A partir da geração F_5 as populações aumentaram consideravelmente sua estabilidade genética quanto ao fenótipo espiguetas agrupadas. Linhagens com panícula do tipo 2 começaram a estabilizar apenas a partir de F_6 , até então sempre apresentavam segregantes. Já as populações oriundas de progênies do tipo 3 sempre segregam. Vale ressaltar, que houve seleção de plantas para os diferentes fenótipos da panícula desde a geração F_2 .

Importante enfatizar que os dados da Figura 10 foram obtidos no mesmo ambiente (lavoura e ano) de onde se obteve os dados da Figura 8.

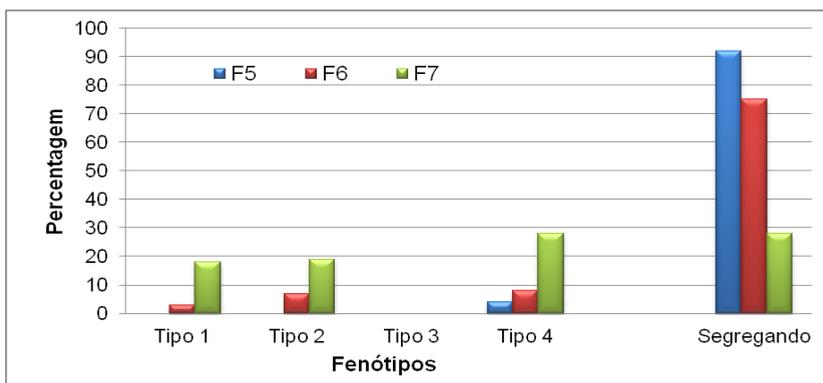


Figura 10. Porcentagem de populações geneticamente estabilizadas para o fenótipo tipo de panícula (Tipo 1, 2, 3 e 4) e populações segregando nas gerações F_5 , F_6 e F_7 .

Trata-se, portanto, de quatro classes fenotípicas, sendo que três delas estabilizam geneticamente a partir de F_5 . Com esta informação é possível descartar a hipótese de apenas um gene estar envolvido no controle da característica espiguetas agrupadas em arroz. De posse desta informação, outras hipóteses foram testadas, como 1:2:1, 9:3:4, 12:3:1, 13:3; 9:7. Mas nenhuma se mostrou eficaz para explicar a segregação, em razão dos desvios estatisticamente significativos obtidos com o teste de X^2 .

Por fim, a hipótese com dois genes controlando a referida característica foi associada com ligação genética entre ambos, a seguir explicitada.

Neste caso, como são quatro classes fenotípicas, o fato de as panículas observadas nas plantas F_1 apresentarem fenótipo intermediário aos pais, sugere que a interação alélica seja de co-dominância. Este resultado também foi verificado por Durão (2008) quando cruzou o genótipo CNA 10928 de espiguetas agrupadas com outro genótipo de panículas simples.

Admite-se para esta hipótese que o gene da mutação sofre interação de epistasia de um segundo gene. Supondo portanto, dois locos 1 e 2, sendo os genótipos $A_$ no locus 1 e $B_$ no locus 2. No locus 1 há ação de dominância entre os alelos sendo $a > A$, e no locus 2 há ação de aditividade entre os alelos (Figura 11). O locus 2 é o que expressa o agrupamento das espiguetas, ou seja, “ b ” é o alelo mutante. O locus 1 tem como produto o fator de inibição (I) e o locus 2 o fator de agrupamento (C). Na presença de uma unidade do fator de inibição (Aa ou aa) tem-se interferência na expressão do agrupamento das espiguetas controlada pelo locus 2, admitindo-se desta forma, que existe ação de epistasia do locus 1 sobre o 2. Segundo Ramalho et al. (1993), diz-se que o alelo da mutação é hipostático, pois sofre ação de epistasia, e o alelo que causa a epistasia é chamado epistático. Neste caso o locus 2 é hipostático e o locus 1 é epistático.

Propõe-se o genótipo $aaBB$ para o genitor SC 339 de panículas simples-tipo 4 pois na presença do genótipo BB não existe fator C, independente da constituição genotípica do loco 1. Para o genitor Multiespigueta é proposto o genótipo $AAbb$ com panículas tipo 1 pois não existe o fator I, e sim, duas unidades do fator C, evidenciando que para ocorrer o fenótipo de panículas tipo 1 é necessário os dois alelos (A e b) em homozigose (Figura 12 e 13; Tabela 7).

Admitindo serem dois locos independentes, o teste de χ^2 revelou que esta hipótese não se ajustava. Portanto, foram testadas outras hipóteses incluindo os dois locos associados por uma possível ligação entre ambos. Após sucessivos testes de χ^2 , foi possível reformular a hipótese de que o loco A e B estariam ligados em repulsão por 30 cM.

O teste do χ^2 para segregação na F_2 dos dois cruzamentos e seus recíprocos demonstrou que o modelo genético proposto se adequou satisfatoriamente ($P > 0,05$) às segregações genéticas esperadas em

relação às observadas (Tabela 8). Esta hipótese explica com alta consistência a natureza dos genes e a ação dos mesmos no controle da característica espiguetas agrupadas. Esta hipótese é coerente também quando se considera no âmbito da análise do problema os genótipos das gerações F_6 e F_7 , e F_1RC_1 destes cruzamentos (Tabela 9 e 10).

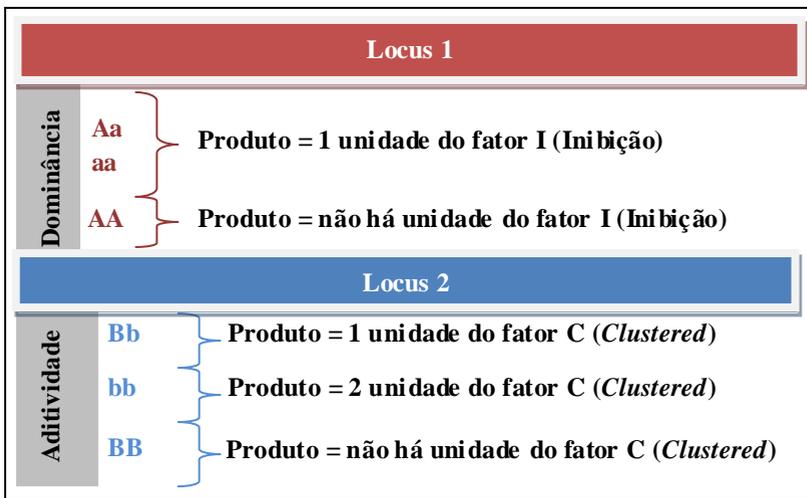


Figura 11. Esquema didático da descrição genotípica dos loci 1 e 2.

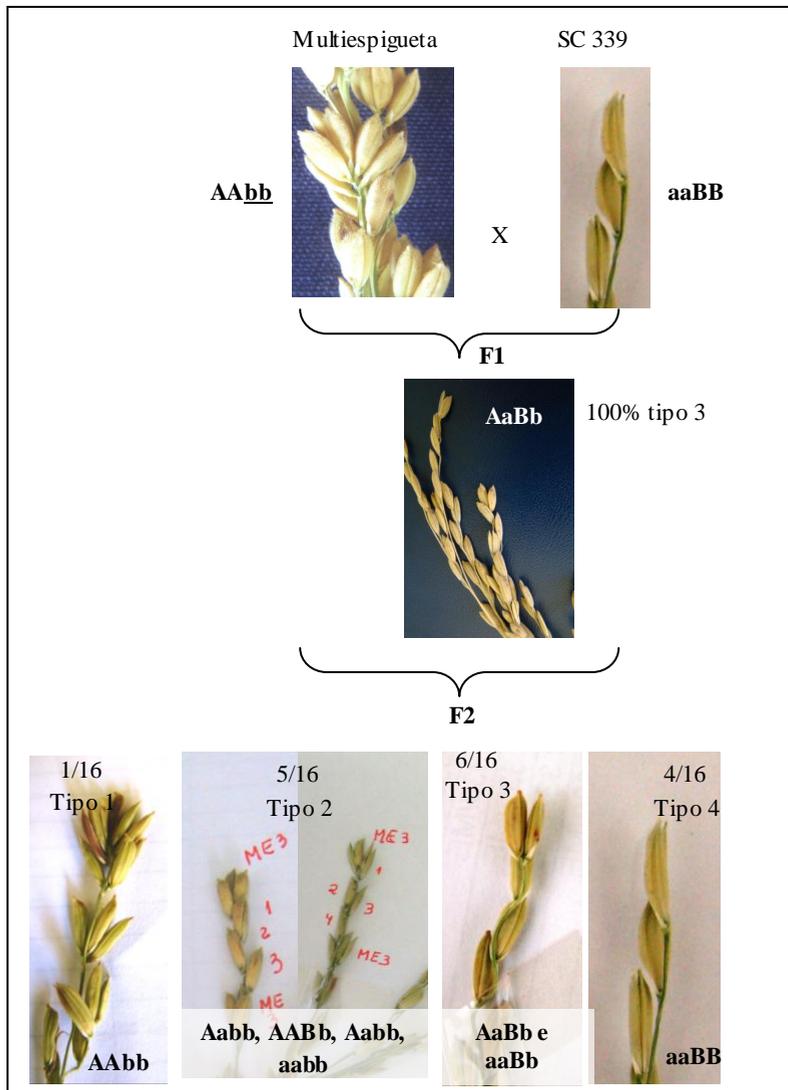


Figura 12. Segregação observada para tipo de panícula nas gerações F₁ e F₂ admitindo que o gene da mutação sofre efeito de epistasia de um segundo gene.

		0,35	0,15	0,15	0,35
		aB	ab	AB	Ab
0,35	aB	aaBB (Tipo 4) 0,1225	aaBb (Tipo 3) 0,0525	AaBB (Tipo 4) 0,0525	AaBb (Tipo 3) 0,1225
0,15	ab	aaBb (Tipo 3) 0,0525	aabb (Tipo 2) 0,0225	AaBb (Tipo 3) 0,0225	Aabb (Tipo 2) 0,0525
0,15	AB	AaBB (Tipo 4) 0,0525	AaBb (Tipo 3) 0,0225	AABB (Tipo 4) 0,0225	AABb (Tipo 2) 0,0525
0,35	Ab	AaBb (Tipo 3) 0,1225	Aabb (Tipo 2) 0,0525	AABb (Tipo 2) 0,0525	AAbb (Tipo 1) 0,1225

Figura 13. Modelo proposto para explicar a frequência genotípica e fenotípica de progênies F₂ admitindo a hipótese do gene da mutação sofrer epistasia com envolvimento de um segundo gene, sendo ambos ligados a 30 cM.

Tabela 7. Descrição dos genótipos e seu respectivo fenótipo e detalhes da ação de cada genótipo, com base na hipótese de o gene da mutação sofrer epistasia de um segundo gene, ambos ligados por 30 cM.

Genótipo	Fenótipo	Detalhes da ação gênica
aaBB	Tipo 4	Genitor recorrente SC 339: panícula simples-tipo 4 pois não possui nenhuma unidade do fator de agrupamento (C).
AaBB	Tipo 4	Panícula simples-tipo 4 pois não possui nenhuma unidade do fator de agrupamento.
AABB	Tipo 4	Panícula simples-tipo 4 pois não possui nenhuma unidade do fator de agrupamento.
AaBb	Tipo 3	Genótipo heterosigoto correspondente ao F ₁ : Panícula tipo 3 pelo fato de haver apenas uma unidade do fator C sofrendo epistasia de uma unidade do fator Inibição (I).
aaBb	Tipo 3	Panícula tipo 3 pelo fato de haver apenas uma unidade do fator C sofrendo epistasia de uma unidade do fator I.
Aabb	Tipo 2	Panículas tipo 2 pelo fato de haver duas unidades do fator C sofrendo epistasia de uma unidade do fator I. O agrupamento das espiguetas é superior ao tipo 3 pelo fato de haver duas unidades do fator C.
AABb	Tipo 2	Panículas tipo 2 pelo fato de haver uma unidade do fator C, sendo o agrupamento das espiguetas superior ao tipo 3 pelo fato de não existir nenhuma unidade do fator I.
aabb	Tipo 2	Panículas tipo 2 pelo fato de haver duas unidades do fator C sofrendo epistasia de uma unidade do fator I. O agrupamento das espiguetas é superior ao tipo 3 pelo fato de haver duas unidades do fator C. Este genótipo justifica a estabilidade genética deste fenótipo em linhagens de arroz.
AABb	Tipo 1	Panículas tipo 1 pelo fato de haver duas unidades do fator C com ausência do fator I.

Tabela 8. Teste de X^2 a partir da segregação de progênies F_2 , de acordo com a hipótese de o gene da mutação sofrer efeito de epistasia de um segundo gene, ambos ligados em repulsão por 30 cM.

Fenótipo	Freq. Obs.	Freq. Esp.	$X^2 = (F_{Obs} - F_{Esp})^2 / F_{Esp}$
SC 339 x Multiespiguetta (n = 180)			
Tipo 3	60	72	2,00
Tipo 4	49	45	0,36
Tipo 2	43	41,4	0,10
Tipo 1	28	21,6	1,60
Σ			4,09
Multiespiguetta x SC 339 (n= 248)			
Tipo 3	106	99	0,49
Tipo 4	56	62	0,58
Tipo 2	66	57	1,42
Tipo 1	20	30	3,33
Σ			5,82
Combinados (SC 339xMultiespiguetta + MultiespiguettaxSC 339) (n = 428)			
Tipo 3	167	171	0,09
Tipo 4	105	107	0,04
Tipo 2	108	98	1,02
Tipo 1	48	51	0,18
Σ			1,33
SCSBRS TioTaka x Multiespiguetta (n = 239)			
Tipo 3	89	96	0,51
Tipo 4	56	60	0,27
Tipo 2	54	55	0,02
Tipo 1	40	29	5,14
Σ			5,94
Multiespiguetta x SCSBRS TioTaka (n= 156)			
Tipo 3	50	62	2,32
Tipo 4	46	39	1,26
Tipo 2	38	36	0,11
Tipo 1	22	19	0,47
Σ			4,16
Combinados (SCSBRS TioTaka x Multiespiguetta) + (Multiespiguetta x SCSBRS TioTaka) (n = 395)			
Tipo 3	139	158	2,28
Tipo 4	102	99	0,09

Tipo 2	92	91	0,01
Tipo 1	62	47	4,79
Σ			7,17
Combinados (n = 823)			
Tipo 3	306	329	1,61
Tipo 4	207	206	0,005
Tipo 2	200	189	0,64
Tipo 1	110	99	1,22
Σ			3,47
$X^2_{\text{Tab}} = 7,81$ (P = 0,05)			

Tabela 9. Teste de X^2 a partir da segregação de progênies F_1RC_1 de acordo com a hipótese de o gene da mutação sofrer epistasia por um segundo gene, ambos ligados em repulsão com 30 cM.

Fenótipo	Freq. Obs.	Freq. Esp.	$X^2 = (F_{\text{Obs}} - F_{\text{Esp}})^2 / F_{\text{Esp}}$
SC 339 x Multiespigueta x SC 339 (n = 73)			
Tipo 3	28	32	0,5
Tipo 4	33	32	0,03
Tipo 2	12	9	0,00
Tipo 1	0	0	-
Σ			0,53
$X^2_{\text{Tab}} = 5,99$ (P = 0,05)			

Os resultados apresentados demonstram que a mutação ocorreu em um gene que sofre ação epistática de um segundo gene, explicando a expressão gênica para diferentes agrupamentos da panícula como os tipos 2 e 3. Molecularmente a epistasia poderia ser um componente decorrente da mutação que induziria alteração na cromatina ou mesmo no padrão de metilação, ou ainda produzindo RNAs de pequeno tamanho, que por vez alterariam o padrão da expressão gênica, produzindo os distintos fenótipos, como é o caso. Liu et al. (2011) afirmam que a característica número de grãos por panícula em arroz facilmente sofrem alterações ambientais e efeitos epistáticos.

Apesar da escassez de informações na literatura sobre a característica espiguetas agrupadas, os resultados obtidos neste trabalho são coerentes aos obtidos por Durão (2008) e por Zheng et al. (2003).

Segundo Valentini (2012), a característica multiflora em aveia nuda também é controlada por um gene que sofre ação de um segundo gene modificador.

Tabela 10. Número de plantas, fenótipo e genótipo nas gerações F₆ e F₇ descendentes de progênes F₅ oriundas do cruzamento entre Multiespigueta e SC 339, admitindo a hipótese de dois genes atuando sobre a mutação.

Ordem	F5		F6 - n = 24			F7 - n = 60		
	Fenótipo	Genótipo	N. plantas	Fenótipo	Genótipo	N. plantas	Fenótipo	Genótipo
1	Tipo 2	Aabb	18	Tipo 2	Aabb	46 14	Tipo 2 Tipo 1	Aabb ou aabb / Aabb
			6	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
2	Tipo 2	AABB	6	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
			13	Tipo 2	AABb	16 12 32	Tipo 4 Tipo 1 Tipo 2	AABB AAbb AABb
			5	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			5	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
3	Tipo 2	AABb	6	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	Aabb
			13	Tipo 2	AABb	10 10 40	Tipo 4 Tipo 1 Tipo 2	AABB AAbb AABb
			1	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
4	Tipo 2	AABb	2	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			21	Tipo 2	AABb	15 13 32	Tipo 4 Tipo 1 Tipo 2	AABB AAbb AABb
			4	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
5	Tipo 2	AABb	6	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			14	Tipo 2	AABb	14 04 42	Tipo 4 Tipo 1 Tipo 2	AABB AAbb AABb
			4	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB

7	Tipo 2	Aabb	20	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
			4	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
8	Tipo 2	AABb	5	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
			3	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			16	Tipo 2	AABb	13 07 40	Tipo 4 Tipo 1 Tipo 2	AABB AAbb AABb
9	Tipo 2	AABb	4	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
			3	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			17	Tipo 2	AABb	05 02 53	Tipo 4 Tipo 1 Tipo 2	AABB AAbb AABb
10	Tipo 2	AABb	8	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
			4	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			12	Tipo 2	AABb	10 13 37	Tipo 4 Tipo 1 Tipo 2	AABB AAbb AABb
11	Tipo 2	AABb	5	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
			5	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			20	Tipo 2	AABb	10 09 41	Tipo 4 Tipo 1 Tipo 2	AABB AAbb AABb
12	Tipo 3	aaBb	4	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			16	Tipo 3	aaBb	10 17 33	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			4	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
13	Tipo 3	aaBb	2	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			18	Tipo 3	aaBb	03 02 45	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			4	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
14			5	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB

	Tipo 3	AaBb	10	Tipo 3	AaBb	16 17 27 02	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3 Tipo 1	aabb aaBB aaBb ou AaBb AAbb
			7	Tipo 2	AABb	33 14 13	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 1	AABb AABB AAbb
			2	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
15	Tipo 3	AaBb	5	Tipo 4	AABB	60	Tipo 4	AABB
			12	Tipo 3	aaBb	10 13 37	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			4	Tipo 2	AABb	33 14 13	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 1	AABb AABB AAbb
			3	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			3	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
16	Tipo 3	AaBb	14	Tipo 3	aaBb	18 10 32	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			4	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
			3	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
			6	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
17	Tipo 3	aaBb	16	Tipo 3	aaBb	12 15 33	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			2	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
			3	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
18	Tipo 3	aaBb	18	Tipo 3	aaBb	08 06 46	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			3	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
			6	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
19			6	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB

	Tipo 3	aaBb	13	Tipo 3	aaBb	05 05 50	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBB
			5	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
20	Tipo 3	aaBb	5	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			13	Tipo 3	aaBb	07 09 44	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBB
			6	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
21	Tipo 3	aaBb	5	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			15	Tipo 3	aaBb	08 12 40	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBB
			4	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
22	Tipo 3	aaBb	5	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			14	Tipo 3	aaBb	07 04 49	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBB
			5	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
23	Tipo 3	aaBb	5	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			14	Tipo 3	aaBb	10 20 30	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBB
			5	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
24	Tipo 3	aaBb	6	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			13	Tipo 3	aaBb	11 17 32	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBB
			5	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
25	Tipo 3	AaBb	5	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			10	Tipo 3	aaBb	14 16 30	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBB

						35 10 15	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 1	AABb AABB AAbb
			7	Tipo 2	AABb			
			2	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
26	Tipo 3	AaBb	7	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			7	Tipo 3	aaBb	06 10 44	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			9	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
			1	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb
27	Tipo 3	aaBb	8	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			11	Tipo 3	aaBb	10 07 43	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			5	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
28	Tipo 3	aaBb	6	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			13	Tipo 3	aaBb	09 11 41	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			5	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
29	Tipo 3	AaBb	6	Tipo 4	aaBB	60	Tipo 4	aaBB
			9	Tipo 3	aaBb	13 15 32	Tipo 2 Tipo 4 Tipo 3	aabb aaBB aaBb
			7	Tipo 2	Aabb	60	Tipo 2	Aabb
			2	Tipo 1	AAbb	60	Tipo 1	AAbb

Para dar maior suporte a hipótese de dois genes, foi realizado cruzamentos dialélicos entre linhagens F₇ com panículas do tipo 1, tipo 2 e tipo 4. A partir das três combinações de cruzamentos dialélicos obteve-se três populações F₁. O número de plantas obtida variou de 13 a 21, e a fenotipagem quanto a estrutura da panícula foi de duas populações com plantas de panículas do tipo 3 e uma do tipo 2 (Tabela 11).

Tabela 11. Fenótipo das plantas F₁ de cruzamentos dialélicos entre linhagens F₇ de arroz.

Genitores	Tipo 1 (AAbb)	Tipo 2 (aabb)	Tipo 4 (aaBB ou AABB)
Tipo 1 (AAbb)		Tipo 2 (Aabb)	Tipo 3 (AaBb)
Tipo 2 (aabb)			Tipo 3 (AaBb ou aaBb)
Tipo 4 (aaBB ou AABB)			

A partir das plantas F₁, foi colhido as sementes F₂ as quais foram plantadas na safra 2011/12. Foram três populações compostas de 223 a 454 plantas. Aceitando a hipótese de que a característica espiguetas agrupadas tem herança qualitativa sendo que o gene da mutação sofre efeitos epistáticos de um segundo gene, ambos ligados em repulsão por 30 cM, tem-se na tabela 12 a segregação das plantas F₂ com a descrição genotípica das linhagens. O teste de qui-quadrado para esta geração permite confirmar a referida hipótese.

Tabela 12. Frequências, segregação e qui-quadrado de progênies F₂ oriundas de cruzamentos dialélicos entre linhagens de arroz envolvendo a característica espiguetas agrupadas.

Cruzamentos	Frequências	Segregação quanto ao tipo de agrupamento da panícula*				X ²
		1	2	3	4	
1 (AAbb) x 4 (AABB) N = 223	Observada	16	70	82	55	0,37
	Esperada	14	69	84	56	
1 (AAbb) x 2 (aabb) N = 454	Observada	117	337	0	0	0,11
	Esperada	114	340	0	0	
2 (aabb) x 4 (AABB) N = 271	Observada	22	74	99	70	2,98
	Esperada	17	85	101	68	

CONCLUSÕES

A mutação para característica espiguetas agrupadas é de base qualitativa, sendo que este gene deve sofrer efeito de epistasia de um segundo gene, e ambos são ligados em repulsão por 30 cM. A interação alélica é de co-dominância.

CAPÍTULO II

Efeito do fenótipo espiguetas agrupadas sobre características agronômicas em linhas endogâmicas recombinantes de arroz

RESUMO: A característica espiguetas agrupadas em arroz (*Oryza sativa* L.) é, a princípio, uma característica potencial no melhoramento genético pois a presença de muitas espiguetas agrupadas no mesmo nó do ráquis, poderia incrementar um dos principais componentes de rendimento, qual seja, o número de grãos por panícula. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da característica espiguetas agrupadas sobre características agronômicas importantes. Para isso, foram utilizadas linhas endogâmicas recombinantes (LERs) contrastantes quanto ao grau de agrupamento das espiguetas. Estas LERs são oriundas do cruzamento entre o acesso Multiespigueta e SC 339. O delineamento foi de blocos casualizados com três repetições em duas safras (dois ciclos agrícolas). Os resultados demonstraram que as melhores produtividades são obtidas com linhagens de panículas do tipo 4 (espiguetas não agrupadas) seguidos do tipo 1 e 2 (agrupadas em diferentes graus), respectivamente. A característica espiguetas agrupadas não contribuiu significativamente para a melhoria dos componentes de rendimentos para as linhagens de arroz avaliadas.

ABSTRACT: The characteristic clustered spikelets in rice (*Oryza sativa* L.) is, at first, a trait in potential breeding because the presence of many spikelets clustered on the same node of the rachis, could increase a major yield components, namely, the number of grains per panicle. The aim of this study was to evaluate the effect of the characteristic clustered spikelets in important agronomic characteristics. For this, we used recombinant inbred lines contrasting the degree of clustering of spikelets. These lines are derived from the cross access Multiespigueta and SC 339. The experimental design was a randomized block design with three replications in two seasons (two agricultural cycles). The results showed that the best yields are obtained with strains of panicles type 4 (spikelets ungrouped) followed type 1 and 2 (grouped into different grades), respectively. The characteristic clustered spikelets not contributed significantly to the improvement of the components of income for rice lines evaluated.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das espécies agrícolas de maior importância econômica para o estado de Santa Catarina. O cultivo do arroz irrigado através do sistema conhecido como pré-germinado, mostrou-se altamente rentável nas propriedades familiares da região litorânea e vale do Itajaí (EPAGRI, 2005). A orizicultura envolve 8.377 agricultores, que cultivam anualmente 150.000 ha do cereal em 11.230 pequenas propriedades agrícolas, distribuídos em 83 municípios, o que sustenta um parque industrial de 66 agroindústrias, gerando 50 mil empregos diretos e indiretos. Com a ajuda da orizicultura, o estado mantém-se como sétimo maior produtor de alimentos do país, embora detenha somente 1,12% do território nacional (ICEPA, 2012).

O sucesso do sistema deve-se principalmente ao desenvolvimento de tecnologia adequada que foi transferida ao produtor pelo serviço de pesquisa e extensão rural da Epagri. Neste sentido, a principal tecnologia transferida são as cultivares melhoradas, consideradas determinantes para o sucesso da orizicultura no estado catarinense. As atividades de melhoramento genético em Santa Catarina foram iniciadas pelo IPEAS – Urussanga, pela Empasc –Itajaí e continuadas pela Epagri através da Estação Experimental de Itajaí (EEI) (MARSCHALEK, et al., 2008).

Os resultados da pesquisa orizícola em Santa Catarina mostram que em 1970, a produtividade era de 2 t/ha, e hoje é de 7,1 t/ha (ICEPA, 2012). Apesar de todo este sucesso, o melhoramento genético deste cereal depara-se com um grande obstáculo, superar a estagnação da produtividade que perdura dez anos. Por outro lado, é também evidente que a média de produtividade de arroz irrigado do Estado de Santa Catarina é menor que o potencial produtivo das atuais cultivares, o que leva inevitavelmente à conclusão de que, para elevar-se a produtividade de arroz do Estado, são necessárias ações de extensão e assistência técnica, e não somente de pesquisa em melhoramento genético.

A despeito da lacuna existente entre produtividade real e potencial, a busca por maiores incrementos na produtividade é um alvo contínuo no melhoramento genético de qualquer cereal, e, no caso do arroz, algumas alternativas mais evidentes de se trabalhar isto é alterar os componentes de rendimento, sendo eles, espiguetas por panícula, panícula por planta, peso de mil grãos e esterilidade.

As panículas de arroz apresentam uma espiguetas para cada nó do raquis. O fenótipo espiguetas agrupadas em arroz caracteriza-se por apresentar duas a seis espiguetas agrupadas no mesmo nó do raquis da panícula, podendo constituir-se pois em característica promissora para o melhoramento genético deste cereal. Multiespigueta é o acesso do banco de germoplasma da Epagri que possui esta característica. Também é relatado no Brasil, pela Embrapa/CNPAF (DURÃO, 2008) a linhagem CNA 10928, como detentora de fenótipo semelhante ao descrito pela Epagri (YOKOYAMA, 1999). O cruzamento deste acesso com um genitor de panículas normais permitiu a obtenção de linhas endogâmicas recombinantes estabilizadas geneticamente em três fenótipos: *Tipo 1* = Com 95% das espiguetas agrupadas; *Tipo 2* = Três grãos agrupados no ápice da panícula seguidos de três ou quatro grãos simples e mais três grãos agrupados; *Tipo 4* = Panículas normais, com 100% das espiguetas não agrupadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da característica espiguetas agrupadas sobre caracteres agronômicos importantes para arroz através de linhas endogâmicas recombinantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 11 linhas endogâmicas recombinantes (LERs) de arroz, as quais foram desenvolvidas na Epagri-EEI na safra 2004/2005 no âmbito do programa de melhoramento de arroz (Marschalek e Raimondi, inf. Pessoal) (Tabela 13). Todas as linhagens apresentam ciclo longo, estatura elevada de planta, grãos longos finos de pericarpo branco, suscetíveis a acamamento e a brusone, ausência de aristas, panículas longas, perfilhamento intermediário, diferindo apenas quanto a estrutura da panícula cujo fenótipo é descrito na Tabela 13. As LERs são descendentes do cruzamento entre a linhagem SC 339 com o acesso Multiespigueta. As linhagens selecionadas tiveram os respectivos fenótipos também nas gerações F₆ e F₅.

As LERs foram semeadas em caixas de madeira com solo arenoso e quando as plântulas tinham três a quatro folhas foram transplantadas manualmente na lavoura em parcelas compostas de cinco linhas, sendo 12 plantas por linhas espaçadas por 30 cm. O sistema de cultivo seguiu o preconizado pela Epagri (EBERHARDT e

SCHIOCCHET, 2012). O experimento foi conduzido em dois anos no delineamento de blocos ao acaso com três repetições e três testemunhas (SC 339, Multiespigueta e CNA 10928).

As LERs foram fenotipadas quanto a produtividade, número de grãos por panícula, número de panículas por planta, comprimento de panícula, esterilidade de grãos e peso de 1000 grãos.

O número de grãos por panícula foi estimado a partir da contagem de todos os grãos presentes na panícula e adotado a média de 10 panículas. A esterilidade foi mensurada pela contagem dos grãos cheios e vazios, os quais foram transformados em porcentagem em relação ao número total de grãos. O peso de 1000 grãos foi estimado a partir do peso em gramas de 1000 grãos selecionados aleatoriamente. O número de panículas por planta foi mensurado a partir da média de dez plantas de cada LER. A produtividade foi mensurada a partir do peso das linhas centrais de cada parcela.

Para analisar os resultados foi utilizado análise de variância conjunta dos dois experimentos (ano 1 e ano 2) e teste de separação de médias com Skott-Knott (5% de significância) com auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006).

Tabela 13. Fenótipo de linhagens de arroz e três testemunhas.

LERs	Fenótipo da panícula
01	Tipo 1 = 95-100% das espiguetas agrupadas
02	Tipo 1 = 95-100% das espiguetas agrupadas
03	Tipo 1 = 95-100% das espiguetas agrupadas
04	Tipo 1 = 95-100% das espiguetas agrupadas
05	Tipo 1 = 95-100% das espiguetas agrupadas
06	Tipo 2 = 3 grãos agrupados no ápice, seguidos de 3 ou 4 grãos simples e novamente 3 grãos agrupados
07	Tipo 2 = 3 grãos agrupados no ápice, seguidos de 3 ou 4 grãos simples e novamente 3 grãos agrupados
08	Tipo 4 = Panícula sem agrupamento das espiguetas
09	Tipo 4 = Panícula sem agrupamento das espiguetas
10	Tipo 4 = Panícula sem agrupamento das espiguetas
11	Tipo 4 = Panícula sem agrupamento das espiguetas
Testemunhas	
SC 339	Tipo 4 = Panícula sem agrupamento das espiguetas
CNA10928	Tipo 1 = 95-100% das espiguetas agrupadas
Multiespigueta	Tipo 1 = 95-100% das espiguetas agrupadas

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância conjunta apresentou significância para a interação anos x linhagens, evidenciando que as linhagens tem comportamento diferenciado dentro de safra (Tabela 14). Para as características grãos por panícula e peso de mil grãos, a análise conjunta não foi estatisticamente significativa. No entanto, é importante considerar que no ano 1 houve fenômenos climáticos (temporais) durante o estágio de maturação do arroz, e o consequente acamamento contribuiu para o degrane.

A produtividade variou de 0,9 a 8,4 t/ha, sendo estes extremos atribuídos aos genitores Multiespigueta e SC 339 respectivamente. As maiores produtividades foram obtidas por genótipos com panícula do tipo 4 (simples, não agrupadas), seguidas do tipo 1 e 2 respectivamente. Este resultado é semelhante ao obtido por Colombari Filho et al. (2013), Durão (2008) e Zheng et al., (2003), que também analisaram a produtividade em genótipos de espiguetas agrupadas.

A produtividade de grãos é uma característica afetada por muitos fatores como componentes de rendimento, e inclusive o ciclo. A variação alélica que existe para ciclo no genoma do arroz pode contribuir com uma associação genética favorável para a produtividade, como variedades de arroz de ampla adaptabilidade. De oito QTLs mapeados para ciclo, seis possuem efeito significativo com a produtividade, entre os quais, o pleiotropismo de *Ghd7* e DTH8 (*Ghd8*) já foram clonados, os demais permanecem em teste (LIANG et al., 2013). *Ghd7* foi o primeiro gene reportado que tenha ação de pleiotropismo com ciclo e produtividade. Este gene em variedades de arroz como Zhenshan 97 ocasionou ciclo prolongado, aumento na estatura de planta, aumento no número de grãos por panícula e consequentemente aumento de produtividade (LIANG et al., 2013). Existem relatos de que este gene também contribui positivamente para o incremento em número de panículas por planta (CAO et al., 2010). O gene *Ghd8* contribui de maneira favorável com as mesmas características supracitadas (YAN et al., 2011).

Liu et al. (2011) também relatam que a característica número de grãos por panícula pode ser influenciada pelo ciclo. Segundo os autores, a super expressão dos genes RCN1 e RCN2 podem estender a fase de crescimento vegetativo no meristema apical principal o que permite que

a planta invista na formação do raquis no meristema floral, resultando no aumento do número de grãos por panícula. A super expressão do gene RCN1 resulta no atraso do ciclo (13-50 dias), o que está relacionado a supressão de processos envolvidos na transição do meristema apical vegetativo para o reprodutivo resultando no aumento do número de grãos por panícula decorrentes do aumento de ramos primários e secundários (LIU et al., 2011).

O ciclo das linhagens testadas neste trabalho variou de 135 a 141 dias da sementeira até a maturação, muito semelhante as testemunhas SC 339 (141 dias) e CNA 10928 (140 dias). Como não houve diferença entre as linhagens, esta característica não se encontra citada na tabela 15. A testemunha Multiespigueta foi a única que diferiu das demais com um ciclo super longo de 188 dias no ano 1 e 263 no ano 2. Com base nos resultados obtidos e relatos de Liang et al. (2013), o ciclo parece não estar afetando a produtividade.

O Multiespigueta tem ciclo super longo com uma produtividade muito baixa, no entanto, não deve-se associar o baixo rendimento a este fator, pois é mais evidente que a baixa produtividade esteja associada a alta esterilidade deste acesso, a qual foi de 33% no ano 1 e 60,9 % no ano 2. Para uma cultivar comercial, a esterilidade natural dos grãos gira em torno de 15%. Apenas a LER 04 e a testemunha SC 339 mostraram esterilidade próxima ao normal. A esterilidade de grãos é uma característica bastante influenciada pelo ambiente pois mostrou resultados bastante variáveis nos dois anos de avaliação.

O número de grãos por panícula foi similar entre as LERs, havendo pouca superioridade para a linhagem 11 de panículas tipo 4 (sem agrupamento das espiguetas) e para a testemunha CNA 10928 de panículas tipo 1 (panículas bastante agrupadas).

As LERs foram muito similares quanto ao número de panículas por planta, no entanto a testemunha Multiespigueta, foi superior as demais.

Houve diversidade quanto ao comprimento de panículas, sendo que a testemunha Multiespigueta foi inferior a todos os demais materiais avaliados. Todas as LERs mostraram comprimento de panícula semelhante à testemunha SC 339, com exceção das LERs 04 e 05 que foram semelhantes ao Multiespigueta, ambas com panículas tipo 1.

O peso de mil grãos ideal para arroz *indica*, cultivado no Brasil é geralmente entre 27-30 gramas. A maioria das LERs mostraram

valores próximos a esta referência, com exceção das linhagens 02, 04, 10, 06 e as testemunhas Multiespigueta e CNA 10928.

Obtiveram-se coeficientes de variação que representam precisão aceitável para todas as características avaliadas, sendo mais altos para esterilidade (23,439). Os menores valores foram para comprimento de panícula (7,22) e produtividade (8,841). Lopes (2002) encontrou CV para produtividade de arroz de 17,8% e Rangel et al. (1998) cita valores de 17 e 26%.

Não houve associação positiva quanto aos componentes de rendimento e o agrupamento das espiguetas. Observa-se que as melhores características agronômicas (alta produtividade, baixa esterilidade, panículas longas, muitos grãos por panícula e peso de mil grãos em torno de 30g) para o melhoramento genético do arroz estão em linhagens com menor agrupamento das espiguetas.

Avaliações feitas em linhagens com espiguetas agrupadas do tipo 1, 2 e 3, no âmbito do programa de melhoramento de arroz (Marschalek e Vieira, inf. Pessoal), foi evidenciado que na presença do agrupamento dos grãos constata-se redução da qualidade dos mesmos, considerando, mancha de grãos, grãos tortos, altos valores de gesso (centro branco), maior incidência de grãos quebrados, menor rendimento industrial para grãos inteiros.

Segundo Ikeda et al. (2010), panículas de arroz com muitos grãos ocasionam a baixa qualidade dos mesmos devido a uma desordem na formação dos grãos e a um declínio na fertilidade, supostamente decorrente de efeitos pleiotrópicos. Taguchi-Shiobara et al. (2011) evidenciaram que panículas de arroz com muitos grãos também estavam associadas a baixa qualidade, principalmente mancha de grãos.

CONCLUSÕES

A característica espiguetas agrupadas não contribuiu significativamente para a melhoria dos componentes de rendimentos para as linhagens de arroz avaliadas.

Tabela 14. Características agrônômicas de linhas endogâmicas recombinantes (LER) descendentes do cruzamento entre Multiespigueta e SC 339, e três testemunhas.

LE Rs	Fenótipo	Produtividade (t/ha)		Esterilidade (%)		Grãos/ Panícula	
		Ano1	Ano2	Ano1	Ano2	Ano1	Ano2
01	Tipo 1	A 3,9 c	B 5,7 d	A 18,4 b	B 35,4 c	112 c	121 a
02	Tipo 1	A 3,3 c	B 6,6 c	A 16,5 b	A 21,6 d	86 c	109 a
03	Tipo 1	A 3,8 c	B 6,3 c	A 19,4 b	B 35,9 c	92 c	113 a
04	Tipo 1	A 2,5 d	B 5,4 d	A 34,6 a	B 24,7 d	78 c	115 a
05	Tipo 1	A 2,4 d	B 6,2 c	A 40,3 a	B 34,7 c	82 c	100 a
06	Tipo 2	A 3,5 c	B 4,2 e	A 14,6 b	A 14,6 d	91 c	81 a
07	Tipo 2	A 3,8 c	A 3,5 e	A 20,4 b	B 64,9 a	89 c	84 a
08	Tipo 4	A 4,3 b	B 6,1 c	A 19,6 b	B 49,6 b	90 c	107 a
09	Tipo 4	A 4,7 b	B 7,6 b	A 25,7 b	B 38,7 c	95 c	105 a
10	Tipo 4	A 4,3 b	B 7,5 b	A 19,2 b	A 20,5 d	89 c	120 a
11	Tipo 4	A 3,6 c	B 7,0 c	A 19,6 b	A 23,3 d	126 b	171 a
SC 339	Tipo 4	A 4,5 b	B 8,4 a	A 13,6 b	B 28,1 c	98 c	117 a
CNA10 928	Tipo 1	A 4,1 c	B 6,9 c	A 24,7 b	B 36,1 c	158 a	149 a
Multies- pigueta	Tipo 1	A 0,9 e	A 0,9 f	A 33,0 a	B 60,9 a	66 c	102 a
LEs	Fenótipo	Panícula/planta		Comprimento panícula (cm)		Peso de mil grãos (g)	
		Ano1	Ano2	Ano1	Ano2	Ano1	Ano2
01	Tipo 1	A 14 b	A 15 c	A 25,2 a	A 27,1 a	27,6 c	27,5 a
02	Tipo 1	A 14 b	B 27 b	A 23,0 b	B 26,8 a	28,4 b	27,0 a
03	Tipo 1	A 17 b	A 19 c	A 22,0 c	A 23,8 b	27,1 c	26,3 a
04	Tipo 1	A 16 b	B 27 b	A 18,6 e	A 19,6 c	28,6 b	22,1 b
05	Tipo 1	A 16 b	B 25 b	A 18,9 e	B 21,3 b	30,0 b	27,9 a
06	Tipo 2	A 15 b	A 17 c	A 21,9 c	B 24,8 a	24,2 c	23,7 b
07	Tipo 2	A 15 b	B 26 b	A 21,5 d	A 22,0 b	31,8 b	28,2 a
08	Tipo 4	A 16 b	A 21 c	A 25,8 a	A 26,1 a	39,8 a	29,2 a
09	Tipo 4	A 17 b	A 15 c	A 24,9 a	A 24,2 a	31,1 b	32,4 a
10	Tipo 4	A 16 b	A 19 c	A 20,5 d	B 22,7 b	26,4 c	25,5 b
11	Tipo 4	A 13 b	A 13 c	A 21,2 d	A 22,8 b	24,6 c	23,5 b
SC 339	Tipo 4	A 15 b	A 16 c	A 23,8 b	B 25,8 a	30,3 b	29,0 a
CNA10 928	Tipo 1	A 14 b	B 20 c	A 23,5 b	A 23,0 b	25,2 c	24,9 b
Multies- pigueta	Tipo 1	A 40 a	A 37 a	A 17,0 f	A 18,3 c	21,4 c	23,9 b

Valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente na coluna pelo teste de Scott Knott a 5% de significância. Valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente na linha pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

CAPÍTULO III

RM 6446 e RN 20330 como marcadores para caracterizar o fenótipo espiguetas agrupadas em arroz

RESUMO: A característica espiguetas agrupadas em arroz representa considerado potencial de uso no melhoramento genético deste cereal. Por ser uma característica raramente descrita na espécie, é importante o conhecimento sobre a localização do(s) gene(s) assim como, a disponibilidade de marcadores moleculares que permitam identificar os genótipos correspondentes à este fenótipo, permitindo que o melhoramento a utilize com maior eficiência. O objetivo deste trabalho foi verificar se os marcadores RM 6446 e RM 20330 caracterizam o fenótipo espiguetas agrupadas a partir de populações oriundas do acesso Multiespigueta da Epagri, assim como ocorreu com o CNA 10928 da Embrapa. Realizaram-se estas análises a partir de populações oriundas do cruzamento entre o acesso Multiespigueta da Epagri e a linhagem SC 339, sendo utilizado o bulk de LERs em F₇. Os resultados demonstraram que o SSR RM 6446 não é polimórfico para a característica em estudo. Já o marcador RM 20330 caracterizou eficientemente LERs de panículas agrupadas os quais apresentaram o alelo de 260 pb, e LERs de panículas não agrupadas que apresentaram o alelo 265 pb.

ABSTRACT: The characteristic rice clustered spikelets is considered potential use in genetic improvement of this cereal. Being a feature rarely found in the species, it is important to know about the location (s) gene (s) as well as the availability of molecular markers to identify the genotypes corresponding to this phenotype, allowing the upgrade to use more efficiency. The aim of this study was to determine whether markers RM 6446 and RM 20330 characterize the phenotype clustered spikelets in populations derived from access Epagri's Multiespigueta, as occurred with the Embrapa's CNA 10928. These analyzes were conducted from populations derived from the cross access Epagri Multiespigueta and SC 339, and used the bulk in F₇. The results showed that the SSR RM 6446 not is polymorphic for the trait under study. Already marker RM 20330 characterized lines efficiently in clustered panicles which showed the 260 bp allele, and not clustered panicle showed that the 265 bp allele.

INTRODUÇÃO

Marcador molecular é todo polimorfismo detectado na seqüência do DNA, podendo ser uma região do genoma expressa ou não. Os marcadores moleculares podem ser caracterizados como dominantes ou codominantes. Os dominantes são marcadores que não distinguem homozigotos de heterozigotos, ao contrário dos codominantes. Enquadram-se como dominantes os AFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) (VOS et al (1995) e RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente) (WELSH e MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990). Os codominantes mais conhecidos e utilizados são os Microssatélites ou SSR (Repetições de seqüência simples) e RFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) (BOTSTEIN et al.,1980). Com utilização crescente, tem-se os SNPs, um tipo de marcador molecular capaz de diferenciar indivíduos por meio de variação em apenas um nucleotídeo da seqüência de DNA, codificadoras ou não. Os SNPs (Polimorfismo de um único nucleotídeo) mais comuns encontrados em diferentes espécies são os de transição (em que uma base púrica é substituída por outra púrica) e de transversão (em que uma base púrica é substituída por uma pirimídica, ou vice-versa) (WEISING, et al., 2005).

A utilização de marcadores moleculares no mundo inteiro é crescente e promissora, principalmente, pelo fato de ser um método seguro, uma vez que não é afetado pelo ambiente e permite, com maior segurança, descrever as diferenças entre os acessos, reunindo informações úteis ao melhoramento genético, além de servir como complementação à técnicas morfológicas, bioquímicas e citológicas (WEISING et al., 2005).

Em arroz, os marcadores SSR são bastante utilizados devido a sua integração com mapas genéticos e físicos, além de, simultaneamente, proporcionar aos melhoristas e geneticistas uma eficiente ferramenta para conectar variações fenotípicas e genotípicas.

Marcadores microssatélites (SSR) são baseados na amplificação de seqüências de DNA compostas por um número variável de nucleotídeos, repetidos várias vezes e encontradas no genoma de eucariotos. O alto grau de multialelismo e a herança mendeliana codominante dos microssatélites fornecem uma ferramenta molecular útil

para estudos de variabilidade genética, filogenia, evolução e conservação de espécies.

Os SSR são pequenas sequências de 1 a 4 nucleotídeos adjacentemente (*tandem*) repetidos e amplamente distribuídos no genoma de plantas superiores. As primeiras identificações de SSR em plantas foram feitas em 1993 através de uma busca de banco de dados de seqüências de DNA publicadas (MORGANTE e OLIVIERI, 1993). Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), os sítios SSR acontecem de um a cada 50 mil pares de bases em plantas.

As diferentes repetições de SSR são divididas em repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; repetições imperfeitas quando as sequências repetidas são interrompidas por bases não repetidas; e repetições compostas, quando duas ou mais repetições de SSR estão dispostas adjacentes, podendo ser perfeitas ou imperfeitas (CAIXETA et al., 2006).

O polimorfismo detectado em SSR é originário da variação no tamanho dos produtos de PCR, que geralmente, decorre da diferença no número de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (CAIXETA et al., 2006). Segundo Levinson e Gutman (1987), essa variação no número de repetições pode ter origem em *crossing-over* desigual ou erro da DNA polimerase durante a replicação. Em SSR de feijão, os autores sugeriram que as variações são decorrentes de *crossing-over* desigual (MÉTAIS et al., 2002). Já Caixeta (2002), Rallo et al. (2000) e Gianfranceschi et al. (1998) explicam o polimorfismo encontrado em feijão, em *Olea europaea* e em maçã, respectivamente, como sendo decorrente de deleções e inserções de uma única base ou mesmo de fragmentos longos de DNA em regiões flaqueadoras como fonte de variação de microssatélites.

Diferentes pesquisas têm evidenciado que os dinucleotídeos AT/TA e AG/TC e o trinucleotídeo TAT/ATA são os mais abundantes em plantas, embora existam variações entre espécies e onde a região SSR se encontra (CAIXETA et al., 2006). Em sequências traduzidas (éxon ou ESTs) os trinucleotídeos são mais frequentes, enquanto que em regiões não-traduzidas (íntrons) é mais abundante os di- e tetranucleotídeos. Em arroz, na sub-espécie japônica, os dinucleotídeos GA e AT aparecem em maior frequência, 36% e 15% respectivamente, enquanto que os trinucleotídeos CCG e AAG aparecem com 8% (McCOUCH et al., 2002). De modo geral, a frequência das diferentes

classes de microssatélites diminui à medida que aumenta o tamanho da unidade repetitiva (McCOUCH et al., 1997). De acordo com McCOUCH et al. (2002), em todos os cromossomos do arroz existe uma grande distribuição de SSR, sendo que nos cromossomos 1, 3, 5 e 7 existe maior número de sequências repetidas, comparativamente aos demais.

Regiões contendo sequências simples repetidas são amplificadas individualmente através de PCR utilizando-se um par de iniciadores específicos (de 20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada “ilha” microssatélite, independentemente do elemento repetitivo, constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

A detecção de sequências SSR via PCR é feita em gel de eletroforese utilizando-se poliacrilamida ou agarose. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com nitrato de prata ou brometo de etídio, respectivamente. Alternativamente também podem ser utilizados iniciadores fluorescentes em combinação com seqüenciador semi-automático de DNA.

Cada loco de microssatélites é analisado individualmente ao se utilizar o par de iniciadores específico para sua amplificação. Mais de um loco pode ser analisado de cada vez quando os alelos de cada loco têm tamanhos suficientemente diferentes e migram para zonas separadas no gel. É possível também, utilizarem-se vários iniciadores SSR, independente do tamanho de seus fragmentos, desde que estes iniciadores estejam marcados com fluorescência. Esta técnica chama-se multiplex, mais do que um iniciador SSR é utilizado simultaneamente na mesma reação PCR.

Os SSR são muito freqüentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. A função destas regiões SSR ainda é desconhecida, no entanto, são extremamente úteis como marcadores moleculares para mapeamento genético e análise de diversidade, principalmente pela sua expressão co-dominante, por ser multialélico e ter alto grau de polimorfismo. Panaud et al. (1996) demonstraram que marcadores SSR em arroz são quase duas vezes mais informativos que RFLP.

Mapas de ligação têm sido desenvolvidos e saturados com marcadores SSR em diferentes espécies de plantas, como soja

(CREGAN, et al., 1999), aveia (LIU, et al., 1996), milho (SENIOR, et al., 1996), trigo (RODER et al., 1998), maçã (GIANFRANCESCHI et al., 1998), feijão (YU, et al., 2000) e arroz (TEMNYKH et al., 2001; MCCOUCH et al., 1997, 2002), entre outros. Vários estudos têm demonstrado que mais de 80% dos SSR de *Oryza sativa*, são amplificados em *Oryza glaberrima*, assim como em outras espécies do gênero de genoma AA (Panaud, et. al.; 1996).

A maior limitação dos marcadores SSR é a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores, exigindo pessoal especializado e equipamento sofisticado para sequenciamento automático aliado ao elevado custo de um empreendimento desta natureza (FERREIRA E GRATAPAGLIA, 1998). No entanto, uma vez desenvolvidos, como no caso do arroz, seu uso é relativamente simples e de baixo custo.

Muitos marcadores para número de grãos por panícula são encontrados na literatura. Know et al. (2008) identificaram três QTLs para número de grãos por panícula, localizados nos cromossomos 7, 10 e 11, através de cruzamento entre duas linhagens da sub-espécie *japônica*. Os autores deduziram que o QTL *spp10* deve ser específico para variedades de tipo japônica. Já os QTLs *spp7* e *spp11* além de já terem sido encontrados em outros mapas, foram consistentes nos dois anos deste estudo (GRAMENE, 2008). Próximo ao QTL *spp7* encontraram o QTL *gy7* que controla a produção de grãos. Taguchi-Shiobara et al. (2011) citam ainda os genes DEPI (HUAN et a., 2009) e a alta expressão da enzima OsSPL14 pelo gene GN1 (ASHIKARI et al., 2005; MIURA et at., 2010).

O número de grãos por panícula é um forte componente de rendimento em arroz, e qualquer mudança na estrutura da panícula pode incrementar em produtividade. A característica espiguetas agrupadas é oriunda de mutação natural e diferencia-se de uma panícula normal por apresentar duas a seis espiguetas agrupadas no mesmo nó do raquis da panícula. No Brasil foi primeiramente evidenciada pela Epagri em 1997 com o acesso denominado então de “Multiespigueta”, e posteriormente em 2006 pela Embrapa com o acesso denominado de CNA 10928. Descendentes do cruzamento de Multiespigueta com linhagens de panículas normais mostram diferentes graus de agrupamento que são classificados assim: panículas tipo 1 = 95% das espiguetas agrupadas; tipo 2 = três grãos agrupados seguidos de três a quatro grãos simples e

novamente três grãos agrupados; tipo 3 = apenas dois grãos agrupados no ápice da panícula; tipo 4 = espiguetas não agrupadas – simples.

Para que uma característica seja eficientemente utilizada no melhoramento genético, é importante a disponibilidade de marcadores moleculares que permitam caracterizar este fenótipo. Com isso, é possível disponibilizar ao melhorista ferramentas para seleção assistida com marcadores moleculares, mapeamento genético, e/ou auxiliar outras pesquisas incluindo a sintenia entre espécies.

Durão (2008) através de populações segregantes oriundas do acesso CNA 10928, afirma que esta característica está flanqueada por dois marcadores SSR: RM 6446 e RM 20330, no cromossomo 6.

O objetivo deste trabalho foi verificar se os marcadores RM 6446 e RM 20330 caracterizam o fenótipo espiguetas agrupadas a partir de populações oriundas do acesso Multiespigueta, assim como ocorreu com o CNA 10928 da Embrapa.

MATERIAL E MÉTODOS

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Epagri na Estação Experimental de Itajaí - EEI, localizado em Itajaí, Santa Catarina.

Foram utilizados 12 bulks de linhas endogâmicas recombinantes (LERs) de arroz em geração F₇ oriundas do cruzamento entre SC 339 de panículas tipo 4 com Multiespigueta de panículas tipo 1 (Tabela 15). Cada bulk foi composto de DNA extraído de dez plantas selecionadas ao acaso e misturados em quantidades equimolares. Julga-se apropriado o número de 10 plantas por bulk, sabendo-se que se trata de linhagens estabilizadas geneticamente, e referenciando Fahliani et al. (2011) que utilizaram apenas cinco plantas por bulk. Também incluíram-se na análise quatro testemunhas: SC 339, SCSBRS TioTaka, Multiespigueta e CNA 10928. Os marcadores SSR utilizados foram RM 6446 e RM 20330 (Tabela 16).

Tabela 15. Bulks de linhas endogâmicas recombinantes de arroz oriundas do cruzamento SC 339 com Multiespigueta, e seus respectivos fenótipos.

Bulk	Fenótipo
01	Tipo 1 = quase 100% da panícula com os grãos agrupados
02	Tipo 1 = quase 100% da panícula com os grãos agrupados
03	Tipo 1 = quase 100% da panícula com os grãos agrupados
04	Tipo 2 = 3 grãos agrupados seguidos de 3 simples
05	Tipo 2 = 3 grãos agrupados seguidos de 3 simples
06	Tipo 2 = 3 grãos agrupados seguidos de 3 simples
08	Tipo 2 = 3 grãos agrupados seguidos de 4 simples
09	Tipo 2 = 3 grãos agrupados seguidos de 4 simples
11	Tipo 3 = apenas 2 grãos agrupados no ápice da panícula
12	Tipo 3 = apenas 2 grãos agrupados no ápice da panícula
13	Tipo 4 = Simples = sem agrupamentos
15	Tipo 4 = Simples = sem agrupamentos
Testemunhas	
17-SC 339	Tipo 4 = Simples = sem agrupamentos
18-SCSBRS	Tipo 4 = Simples = sem agrupamentos
TioTaka	
19- Multiespigueta	Tipo 1 = quase 100% da panícula com os grãos agrupados
20-CNA 10928	Tipo 1 = quase 100% da panícula com os grãos agrupados

Tabela 16. Marcadores SSR utilizados para caracterizar o fenótipo espiguetas agrupadas em LERs de arroz.

Marcador SSR	Sequencia	Repet Motif	Temp. anelamento
RM 6446	Reverse: CTTGGTGACGGCGAAGAC Forward: ACCACACGCACACAGTTAGC	GCA (8)	55°C
RM 20330	Reverse: GAATCCTTGGCACTACTCCATCC Forward: ACATCATCTTCGCCAACTATGC	AT (11)	55°C

A extração de DNA foi de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990). Foi utilizado 0,15 g de folhas jovens, as quais após a coleta foram imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em congelador até o momento da extração do DNA.

Para a extração, primeiramente, foi realizada a ruptura dos tecidos por meio de maceração em nitrogênio líquido e, posteriormente, adicionado tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4M, Tris-HCl pH 8 100 mM, EDTA 20 mM, Mercaptoetanol 0,2%, água), que causa ruptura das células por desequilíbrio osmótico devido a presença de NaCl. O SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) é um detergente aniônico que se liga à maioria das proteínas, e também auxilia no processo de lise, o qual foi adicionado juntamente com o tampão. Nesta fase também foi adicionada a enzima RNase para degradar vestígios de RNA. Após a lise das células, foi feita a purificação do DNA utilizando-se uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), que são solventes orgânicos. Em seguida foi adicionado isopropanol gelado no volume equivalente a 2/3 do volume obtido juntamente com 35 uL de acetato de sódio (3M). Logo, as amostras com DNA foram misturadas por inversão e colocadas no freezer a -20°C por pelo menos 2 horas. A precipitação do DNA foi feita com etanol 70% e ao final, o DNA foi ressuscitado com tampão TE (Tris-HCl e EDTA [ácido etilenodiamino tetraacético]), pH 7,4.

Para conhecimento da concentração de DNA foi utilizado um Biophotometer Plus (Eppendorf) e após determinada a concentração, as amostras foram diluídas para concentração padrão de 20 ng/μL e armazenados a 4°C até o uso. A avaliação da qualidade do DNA extraído foi baseada em uma eletroforese horizontal em gel com 0,8 % de agarose e com brometo de etídio (0,5 μg/ml), utilizando-se o tampão TAE 0,5x (Tris-Acetato-EDTA), sob as seguintes condições eletroforéticas: 60 V e 35 mA por 1 hora e trinta minutos.

As reações de amplificação pela técnica SSR foram realizadas seguindo o protocolo de Durão (2008) com algumas modificações: tampão 1 x (Tris-HCl 10 mM/L + KCl 50 mM/L, pH 8,4), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,25 mM/cada, iniciador SSR 0,4 uM, Taq DNA polimerase 1 U, DNA 20 ng, em volume final de 25 uL. As condições de termociclagem foram: 2 minutos de desnaturação inicial (96°C), seguido de 30 ciclos de desnaturação (94° C), anelamento (55° C) e extensão (72° C) de 30 segundos cada, e 30 min de extensão final (72° C). Os produtos resultantes da amplificação SSR foram estudados com auxílio do analisador genético ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados com o software GeneMapper 4.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O marcador RM 6446 não apresentou polimorfismo para a característica espiguetas agrupadas. Já o marcador RM 20330 apresentou dois alelos associados a característica, sendo que, plantas com panículas sem agrupamento, ou seja, tipo 4 (simples), portavam o alelo representado pelo fragmento de 265 pares de bases (pb) (Figura 14B). Já plantas com as espiguetas agrupadas, independente do grau de agrupamento (tipo 1, 2 e 3), apresentaram o alelo 260 pb (Figura 14 A).

O resultado foi confirmado com a análise individual das plantas constituintes dos bulks (Tabela 17). Somente o bulk 06, que apresenta o fenótipo de panículas tipo 2, teve uma planta entre as dez que apresentou os dois alelos. Assim, quatro possibilidades podem ser consideradas: **i.** pode ter havido alguma mistura; **ii.** o *locus* ainda segregava nesta planta embora isso seja pouco provável, ou, **iii.** se deve ao fato de que *loci* microssatélites estão localizados em regiões hipervariáveis do genoma sendo mais sensíveis a mutações (CAIXETA et al., 2006) e talvez, **iv.** o marcador em questão não está próximo o suficiente do gene alvo, permitindo certa taxa de recombinação por permuta genética.

Segundo Durão (2008), o gene para característica espiguetas agrupadas localiza-se flanqueado entre 198 cM (RM 20330) e 138 cM (RM 6446), no cromossomo 6. Com base em mapas físicos do cromossomo 6, existem três mapas que referenciam a característica espiguetas agrupadas (GRAMENE, 2013), e em todos, os marcadores associados a característica estão localizados entre 90 e 200 cM.

Além do Brasil, a característica também foi evidenciada na China (ZHENG et al., 2003) onde os autores realizaram estudos moleculares e também encontraram no cromossomo 6 marcadores associados positivamente a característica espiguetas agrupadas.

Com base nos mapas disponíveis na Gramene, informações de Durão (2008), e com os resultados desta tese, julga-se importante um rastreamento mais intenso ao longo do cromossomo 6 com marcadores SSR, a fim de aproximar-se mais estreitamente do gene possibilitando o mapeamento genético com o Multiespiguetas da Epagri.

Tabela 17. Amplificação dos alelos 260 pb e 265 pb com o marcador RM 20330, através das dez plantas de arroz constituintes dos bulks.

Bulk	Planta	alelos		Bulk	Planta	alelos		Bulk	Planta	alelos	
		260 pb	265 pb			260 pb	265 pb			260 pb	265 pb
1	1	+	-	3	10	+	-	6	8	+	-
1	2	+	-	4	1	+	-	6	9	+	-
1	3	+	-	4	2	+	-	6	10	+	-
1	4	+	-	4	3	+	-	8	1	+	-
1	5	+	-	4	4	+	-	8	2	+	-
1	6	+	-	4	5	+	-	8	3	+	-
1	7	+	-	4	6	+	-	8	4	+	-
1	8	+	-	4	7	+	-	8	5	+	-
1	9	+	-	4	8	+	-	8	6	+	-
1	10	+	-	4	9	+	-	8	7	+	-
2	1	+	-	4	10	+	-	8	8	+	-
2	2	+	-	5	1	+	-	8	9	+	-
2	3	+	-	5	2	+	-	8	10	+	-
2	4	+	-	5	3	+	-	9	1	+	-
2	5	+	-	5	4	+	-	9	2	+	-
2	6	+	-	5	5	+	-	9	3	+	-
2	7	+	-	5	6	+	-	9	4	+	-
2	8	+	-	5	7	+	-	9	5	+	-
2	9	+	-	5	8	+	-	9	6	+	-
2	10	+	-	5	9	+	-	9	7	+	-
3	2	+	-	5	10	+	-	9	8	+	-
3	3	+	-	6	1	+	-	9	9	+	-
3	4	+	-	6	2	+	-	9	10	+	-
3	5	+	-	6	3	+	-	11	1	+	-
3	6	+	-	6	4	+	-	11	2	+	-
3	7	+	-	6	5	+	-	11	3	+	-
3	8	+	-	6	6	+	+	11	4	+	-
3	9	+	-	6	7	+	-	11	5	+	-

...continuação:

Bulk	Planta	alelos		Bulk	Planta	alelos		Bulk	Planta	alelos	
		260 pb	265 pb			260 pb	265 pb			260 pb	265 pb
11	6	+	-	15	1	-	+	18	6	-	+
11	7	+	-	15	2	-	+	18	7	-	+
11	8	+	-	15	3	-	+	18	8	-	+
11	9	+	-	15	4	-	+	18	9	-	+
11	10	+	-	15	5	-	+	18	10	-	+
12	1	+	-	15	6	-	+	19	1	+	-
12	2	+	-	15	7	-	+	19	2	+	-
12	3	+	-	15	8	-	+	19	3	+	-
12	4	+	-	15	9	-	+	19	4	+	-
12	5	+	-	15	10	-	+	19	5	+	-
12	6	+	-	17	1	-	+	19	6	+	-
12	7	+	-	17	2	-	+	19	7	+	-
12	8	+	-	17	3	-	+	19	8	+	-
12	9	+	-	17	4	-	+	19	9	+	-
12	10	+	-	17	5	-	+	19	10	+	-
13	1	-	+	17	6	-	+	20	1	+	-
13	2	-	+	17	7	-	+	20	2	+	-
13	3	-	+	17	8	-	+	20	3	+	-
13	4	-	+	17	9	-	+	20	4	+	-
13	5	-	+	17	10	-	+	20	5	+	-
13	6	-	+	18	1	-	+	20	6	+	-
13	7	-	+	18	2	-	+	20	7	+	-
13	8	-	+	18	3	-	+	20	8	+	-
13	9	-	+	18	4	-	+	20	9	+	-
13	10	-	+	18	5	-	+	20	10	+	-

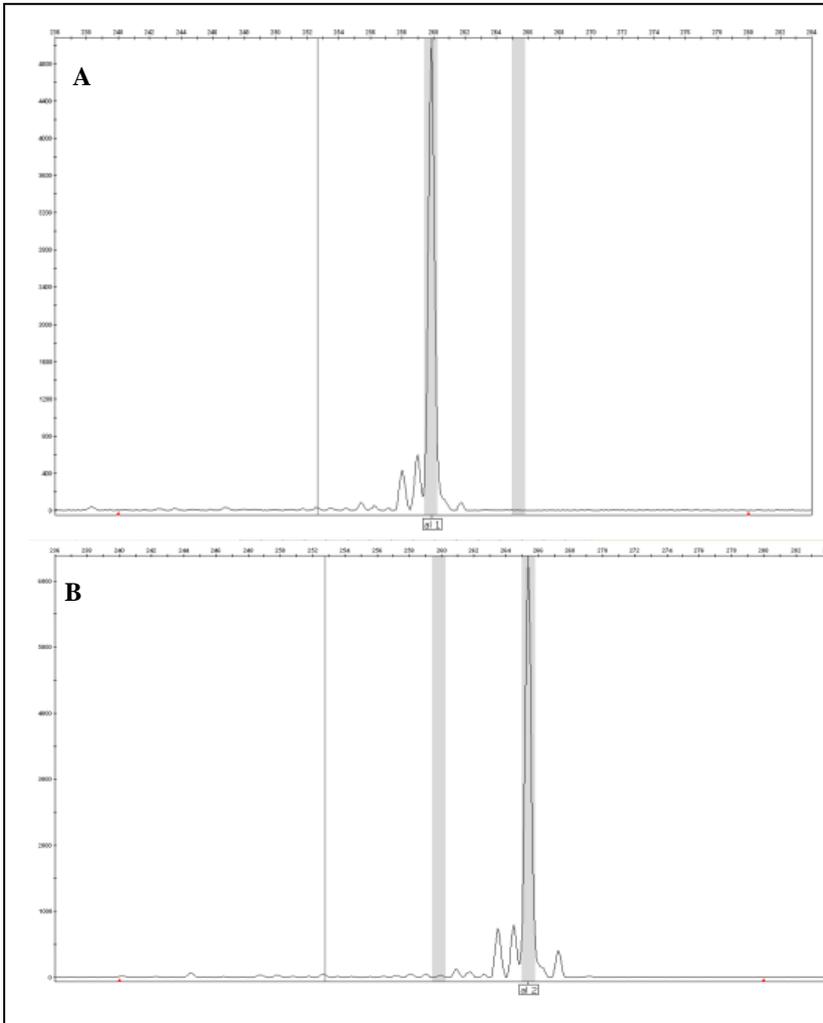


Figura 14. Análise com marcador microsatélite RM 20330, caracterizando LERs que apresentam a característica espiguetas agrupadas com o alelo de 260 pb (A) e LERs simples (que não possuem as espiguetas agrupadas) com o alelo de 265 pb.

CONCLUSÕES

O marcador RM 20330 foi eficiente para identificar os genótipos portadores do fenótipo espiguetas agrupadas da Epagri e também da Embrapa. Já o SSR RM 6446 não é polimórfico para a característica em questão, portanto, não é um marcador.

CAPÍTULO IV

Efeito de deriva de glifosato como indutor da característica espiguetas agrupadas em arroz

RESUMO: Baseado no surgimento da característica espiguetas agrupadas em plantas de arroz da linhagem SC 450 CL após aplicação de glifosato nas taipas, tem-se como objetivo estudar o efeito de deriva de glifosato sobre a expressão da característica espiguetas agrupadas em arroz em três estádios de desenvolvimento. Foi utilizado duas variedades de arroz (SC 450 CL e SCS117 CL), as quais receberam aplicação de glifosato nas dosagens 0, 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha), nos estádios V9, R0 e R1. A deriva de glifosato induz a expressão da característica espiguetas agrupadas nos estádios R0 e R1. Os resultados obtidos também permitem levantar a hipótese de que o glifosato atue no sítio de atuação do hormônio citocinina, e que este, por sua vez, controle a expressão da característica espiguetas agrupadas. Esta hipótese poderá ser testada futuramente.

ABSTRACT: Based on the trait appearance of clustered spikelets on rice on line SC 450 CL after glyphosate application in taipas, the aim of this study was evaluate the effect of glyphosate drift on the expression of the trait in rice clustered spikelets into three developmental stages. We used two varieties of rice (SCS117 CL and SC 450 CL), which received application of glyphosate at doses 0, 1, 5, 10 and 20% of the recommended rate (3 L / ha) at stages V9, R0 and R1. The drift of glyphosate induces the expression of the trait clustered spikelets in stages R0 and R1. The results also allow to hypothesize that glyphosate acts at the site of action of the hormone cytokinin, and this, in turn, control the expression of the characteristic clustered spikelets. This hypothesis can be tested in the future.

INTRODUÇÃO

Na safra 2008/09, em campo de produção de semente básica de arroz da linhagem SC 450 CL, na Epagri – Estação Experimental de Itajaí (EEI), houve a expressão da característica espiguetas agrupadas nas panículas desta linhagem restritamente nas plantas da bordadura (Figura 15). A SC 450 CL é oriunda do cruzamento Epagri 109//Epagri 109/(Irga 369/AS 3510), não havendo nenhum genitor envolvido que expresse a característica espiguetas agrupadas. E mesmo que houvesse, a respectiva linhagem era oriunda de nove ciclos de autofecundação, e portanto, não poderia ser esperado alto grau de segregação, e tampouco de uma forma tão localizada como de fato ocorreu.

Avaliando o histórico desta lavoura, foi concluído que os sintomas se deram devido a deriva de glifosato aplicado nas taipas para limpeza das mesmas na dosagem comercial de 3 L/ha. Não se sabe ao certo qual percentual dessa dosagem atingiu as plantas de arroz.

A expressão da característica foi do tipo 3 (apenas dois grãos no ápice da panícula) e tipo 2 (três grãos agrupados seguidos de quatro grãos simples). Juntamente com a expressão desta característica havia sintomas de fitotoxicidade (esterilidade, inserção incompleta da panícula, grãos tortos).



Figura 15. Panículas da linhagem SC 450 CL com a característica espiguetas agrupadas, fenótipo tipo 2 e 3.

Notadamente, é provável que algum fator fisiológico envolvido na formação da panícula esteja relacionado com a expressão da característica espiguetas agrupadas. Assumindo isso, é possível, que o glifosato tenha sido aplicado no momento em que o arroz estava em algum estágio reprodutivo (R0 ou R1) onde ocorre a formação da panícula, e o estresse teria alterado o posicionamento das espiguetas.

O glifosato ($C_3H_8NO_5P$) é um dos herbicidas mais utilizados na agricultura devido a sua eficiência no controle de plantas daninhas. Este agroquímico age através da inibição enzimática da rota do ácido chiquímico, tendo como resultado a inibição da produção dos aminoácidos aromáticos, essenciais para o crescimento e sobrevivência da planta (VELINI et al., 2009). Segundo Boudet et al. (1985), cerca de 20% de todo o fluxo de carbono nas plantas é processado pela rota do ácido chiquímico.

A recomendação técnica prescrita no registro do produto comercial glifosato junto ao Ministério da Agricultura, é a dosagem de 1 a 5 L/ha. O período de carência do glifosato é de 56 dias, podendo desta forma, manter os limites de resíduo abaixo do parâmetro preconizado pela legislação vigente que é de 10 mg/kg (ANVISA, 2013). Porém, existem dúvidas quanto à segurança desse herbicida, à qualidade dos grãos e do solo. Resíduos da molécula do glifosato e do metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) podem estar presentes em grãos, bem como, podem afetar a concentração de isoflavonas, contaminando inclusive o solo.

Duke et al. (2003), analisando o manejo da soja GM_{RR} tratada com glifosato sob diferentes dosagens, detectaram elevados teores de AMPA nos grãos. Bohn et al. (2008) encontraram resíduos desse herbicida em grãos de soja GM_{RR} superiores ao permitido pela legislação vigente.

Apesar dos episódios negativos, existem muitos relatos que na presença de diferentes doses de glifosato é possível obter resultados diversificados e positivos para a agricultura. Como exemplo, pode-se citar estudos de Sharon et al. (1992), evidenciando que com doses subletais para as plantas é possível reduzir a produção de fitoalexinas, as quais derivam da rota do ácido chiquímico. Com isso, os autores obtiveram respostas positivas na ativação de genes de resistência a doenças no complexo *Cassia obtusifolia* e *Alternaria cassiae*.

Carbonari et al. (2007), verificaram que em doses de glifosato próximas de 720 g/ha é possível obter importantes ganhos na absorção e acúmulo de fósforo nas folhas de citrus, independente dos níveis de fósforo no solo. Os autores levantaram a hipótese de que tal aumento de absorção pode estar associado a aumentos na expressão de genes ligados a proteínas de transporte de fósforo em membranas vegetais, mas ainda não foram realizados estudos que comprovem isso. Godoy (2007) e Meschede et al. (2007) também demonstraram a influência positiva de doses de glifosato na absorção de fósforo por plantas de eucalipto, soja e cana-de-açúcar.

Castro et al. (2009) relatam que o glifosato é utilizado como agente maturador na cana-de-açúcar nas doses de 0,3 a 0,6 L/ha. A maturação é considerada um dos aspectos mais importantes para produção de cana-de-açúcar.

Em arroz apenas foi encontrado o trabalho de Wang et al. (2013), os quais detectaram que plantas transgênicas de arroz com o gene EPSPS conferindo resistência a glifosato, possuem maior taxa fotossintética, maior concentração de triptofano e maior percentagem de germinação, independente da aplicação de glifosato.

Adicionalmente, existe evidências de que este herbicida possa induzir alterações na estrutura da panícula levando a expressão da característica espiguetas agrupadas (EPAGRI, dados não publicados), conforme descrito no início deste capítulo.

Com base no evento descrito e procurando complementar os estudos sobre a característica em questão, compreender as possíveis rotas metabólicas que podem estar envolvidas, sem dúvida são questões relevantes não só em termos da necessidade de avanço científico, mas também de implicações no manejo do cultivo do arroz. O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito de deriva de glifosato sobre a expressão da característica espiguetas agrupadas em arroz em três estádios de desenvolvimento.

Basicamente, os ensaios estabelecidos visaram responder as seguintes perguntas:

1. Se o glifosato poderia ser um dos agentes causadores da expressão da característica espiguetas agrupadas;
2. Se as rotas metabólicas envolvidas na fase reprodutiva do arroz estão diretas ou indiretamente relacionadas com a característica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado duas variedades de arroz, a cultivar SCS117 CL (Epagri 109/ (Irga 369/AS 3510) e a linhagem SC 450 CL (Epagri 109//Epagri 109/(Irga 369/AS 3510)).

As sementes foram semeadas em caixas de madeira com solo (18/10/2012) e no estádio em que as plântulas estavam com 3-4 folhas foram transplantadas (06/11/12) na lavoura em parcelas de 2 x 2 m. O sistema de cultivo foi de acordo com o preconizado na Epagri-EEI (EBERHARDT e SCHIOCCHET, 2012).

Após o transplante, as plantas foram acompanhadas quanto ao seu desenvolvimento fisiológico. A cada semana ocorreu a emissão de uma folha. O arroz entra no estádio R0, onde ocorre a formação da panícula, com aproximadamente 10 folhas (EBERHARDT e SCHIOCCHET, 2012).

O glifosato foi aplicado sobre as variedades na dosagem de 0, 1, 5, 10 e 20 % da dose comercial (3 L/ha) em três estádios de desenvolvimento do arroz, V9 (último estádio vegetativo), R0 (estádio reprodutivo com a formação da panícula) e R1 (onde ocorre a diferenciação das ramificações da panícula).

As aplicações de glifosato foram feitas nos dias 18/12/2012, 26/12/2012 e 02/01/2013 no período da manhã.

As avaliações foram baseadas na percentagem de expressão da característica espiguetas agrupadas através de observações visuais iniciadas em 05/02/2013. Além da avaliação visual, fez-se a medição do tamanho de planta a partir da média de dez plantas, contagem de grãos por panícula, tamanho de panícula, grãos por raquis, número de ramificações primárias, medição da distância entre as espiguetas, todas a partir da média de 20 plantas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas plantas onde o glifosato foi aplicado no estádio V9 não ocorreu a expressão da característica espiguetas agrupada (Figura 16). No estádio R0 para a linhagem SC 450 CL, a partir de 5% da dose do herbicida ocorreu a expressão da característica espiguetas agrupadas do tipo 2 e 3, sendo que a expressão aumentou a medida que a dose de

glifosato foi maior (Figura 17). Neste estágio, na cultivar SCS117 CL a característica foi expressa apenas com 5% da dose. No estágio R1, para linhagem SC 450 CL, a ocorrência da característica foi a partir de 5% da dose de maneira mais intensa do que expresso no estágio R0. Para a cultivar SCS117 CL a expressão do fenótipo também foi mais intensa, no entanto, apareceu apenas com 10% da dose. A resposta diferenciada entre as duas variedades é decorrente da diferença de ciclo, pois a SCS117 CL tem o ciclo de uma semana mais tardio que o SC 450 CL.

A deriva de glifosato também influenciou outras características (Figuras 18 e 19). O tamanho da panícula sofreu reduções nos estádios R0 e R1, principalmente a partir de 5% da dose do herbicida, para as duas variedades. O número de ramificações primárias teve sensível aumento com 1% da dose, porém, a partir de 5% este número reduziu para as duas variedades nos estádios R0 e R1. O número de grãos por panícula e o número de grãos por ráquis reduziu a partir de 5% da dose de glifosato nos três estádios, sendo mais intenso nos estádios reprodutivos. A distância entre grãos quase não sofreu alterações, apenas para variedade SC 450 CL no estágio R1. A altura de plantas reduziu proporcional a percentagem de glifosato, ou seja, quanto maior a dose, maior a redução das plantas.

Os sintomas de fitotoxicidade com o glifosato foram mais intensos no estágio R1 e crescentes com o aumento da dose do herbicida (Figura 20). Dentre os sintomas de fitotoxicidade destaca-se esterilidade de grãos, grãos tortos, inserção incompleta da panícula, folhas amareladas, ciclo prolongado e diferenciado entre as plantas e redução da estatura de plantas.

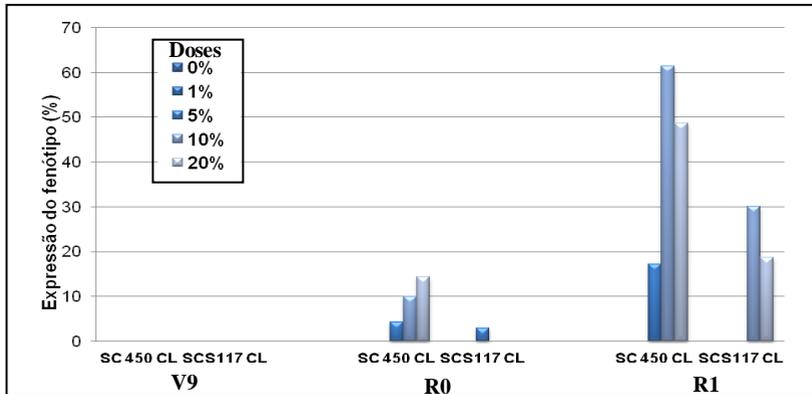


Figura 16. Percentagem da expressão do fenótipo espiguetas agrupadas em duas variedades de arroz submetidas a diferentes doses de glifosato em três estádios de desenvolvimento (V9, R0 e R1).



Figura 17. Expressão do fenótipo espiguetas agrupadas em panículas de arroz da linhagem SC 450 CL após aplicação de 5, 10 e 20% de glifosato nos estádios R0 e R1.

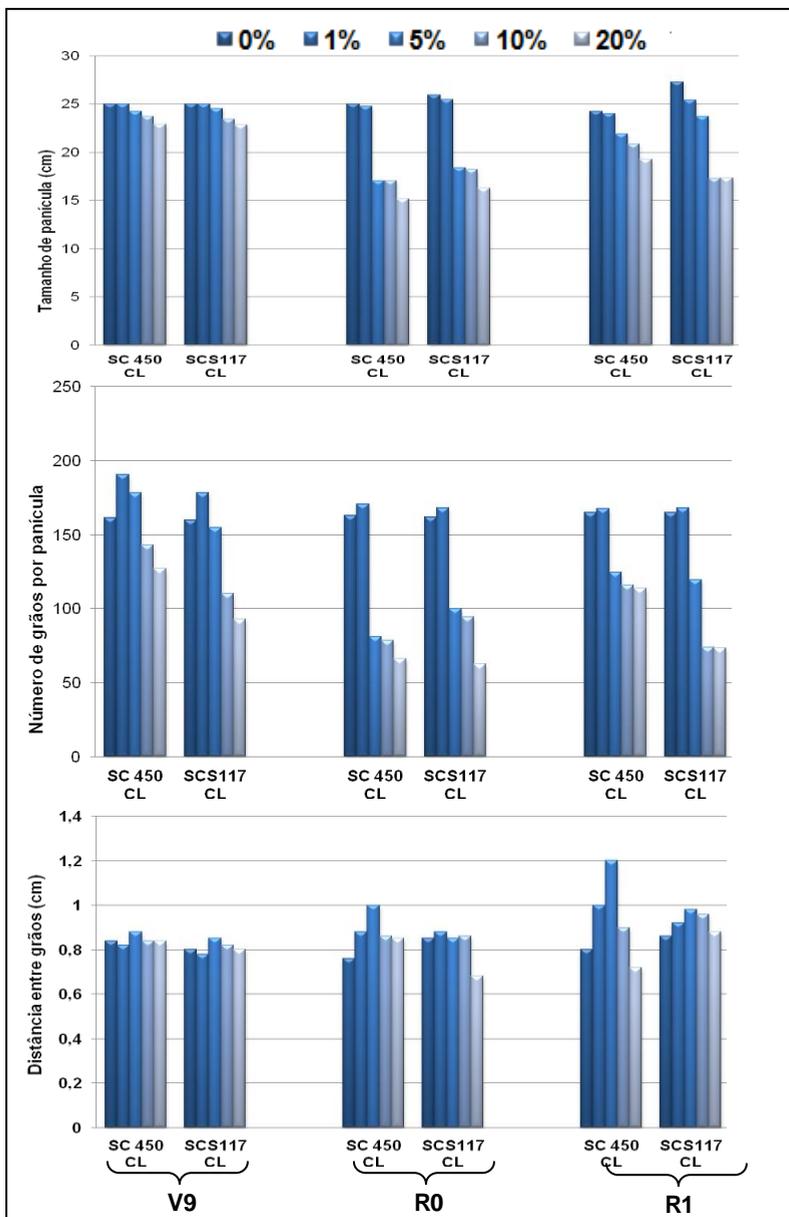


Figura 18. Tamanho de panícula, número de grãos/panícula, e distância entre grãos de duas variedades de arroz em três estádios de desenvolvimento após aplicação de glifosato nas dosagens 0, 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha).

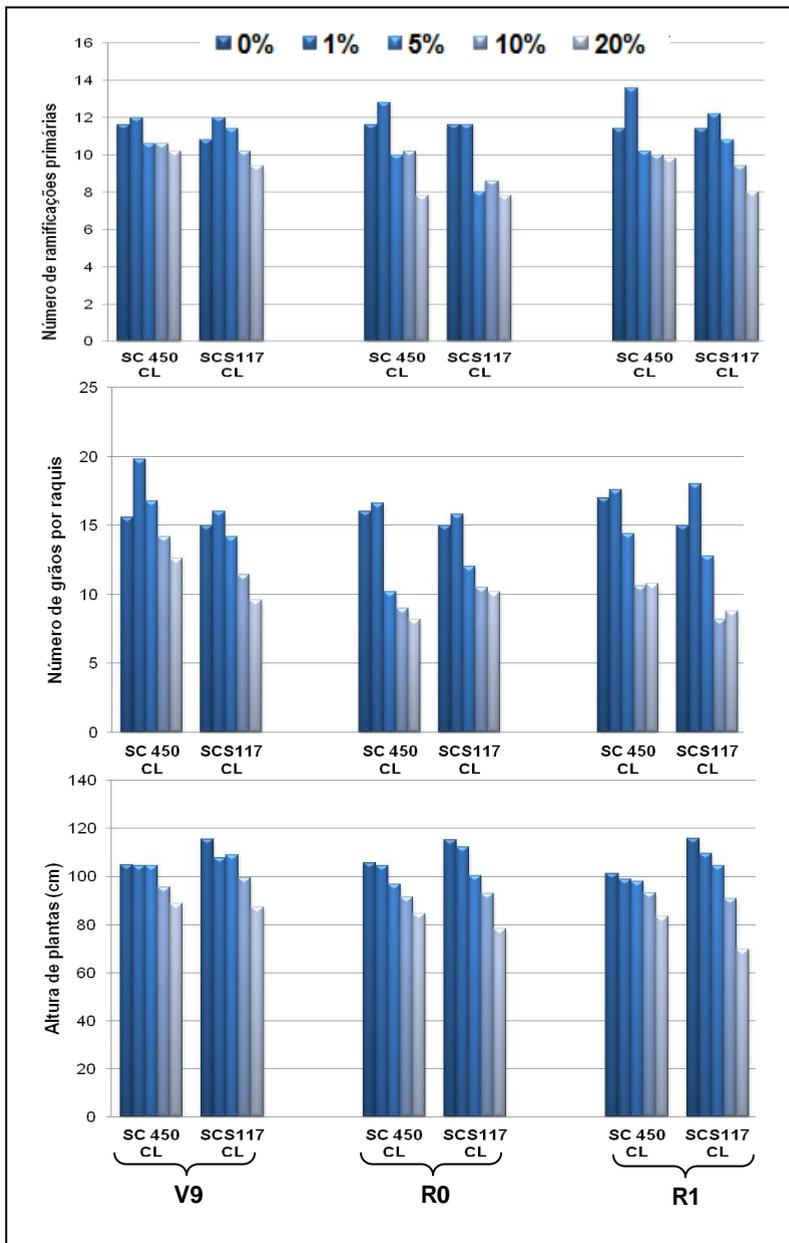


Figura 19. Características de duas variedades de arroz em três estádios de desenvolvimento após aplicação de glifosato nas dosagens 0, 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha).

Nas figuras 20 e 21, é possível visualizar a intensidade de alterações na panícula das variedades SC 450 CL e SCS117 CL, provocadas pelo glifosato. No estágio V9 as alterações na panícula foram poucas, diferente dos estádios R0 e R1. As principais alterações ocorreram a partir de 5% da dose do herbicida. Importante ressaltar que nestes estádios de desenvolvimento ocorre grande demanda de citocininas pelas plantas, necessária para a formação da panícula. Com isso, vale introduzir a hipótese de que o glifosato pode estar atuando em algum sítio de síntese e/ou expressão das citocininas, e portanto, alterando o posicionamento das espiguetas. Esta hipótese é baseada na informação de que o teor endógeno de citocinina controla o número de grãos por panícula em arroz e a sua distribuição (ASHIKARI et al., 2005; ASHIKARI et al., 2008). Fu et al. (2013) evidenciaram que a disponibilidade de fitohormônios influencia diretamente na quantidade de grãos por panícula e no enchimento de grãos.

As citocininas são hormônios reguladores da divisão celular vegetal e importantes para formação dos grãos de arroz (MATSUO, et al., 1995). São sintetizadas nas raízes, em embriões em desenvolvimento, folhas jovens, frutos e nos tecidos da galha da coroa. Em arroz é comprovado que a citocinina é sintetizada principalmente nas raízes (MATSUO et al., 1995). As formas livres de citocinina são zeatina (Z), zeatina ribozídica (Zr), isopentenil adenina (iP) e isopenteniladenosina (iP[9R]).

A citocinina proporciona a ocorrência de um crescimento controlado e organizado da forma e da estrutura das plantas superiores. As citocininas também provocam a diferenciação dos grupos de células que formam os tecidos e que se tornarão futuramente, as diferentes partes das plantas (McGAW et al., 1995). Contudo, vale ressaltar que as citocininas podem interagir com as giberelinas e auxinas.

O fluxo preferencial do hormônio é em direção ao tecido que esteja precisando de uma demanda do hormônio para suas funções específicas. Isso vale tanto para citocininas produzidas na planta quanto para citocininas aplicadas externamente no vegetal.

A citocinina pode ser degradada pela *citocinina oxidase* (OsCKX2) que pode desempenhar um papel na regulação dos níveis endógenos desse hormônio. Uma super-expressão dessa enzima resulta diretamente na redução na quantidade de citocinina. A atividade da enzima é induzida por altas concentrações de citocinina devido, pelo

menos em parte, ao aumento dos níveis do RNA de um subgrupo de genes.

A molécula de glifosato na célula vegetal inibe enzimas da rota do ácido chiquímico diminuindo a biosíntese dos aminoácidos aromáticos, triptofano, fenilalanina e tirosina (SHARON et al., 1992). Segundo Carbonari et al. (2007), o glifosato promove um aumento da absorção e acúmulo de fósforo nas células, o que leva a uma maior expressão de genes que codificam proteínas de transporte do fósforo na membrana plasmática. Sabendo que o fósforo é essencial para síntese de RNA, DNA e citocininas, e que estas últimas podem ter sua síntese a partir no AMP cíclico e tRNA, é possível que o glifosato esteja relacionado com o aumento da divisão e padrão de diferenciação celular. Desta forma, citando o envolvimento das citocininas no processo, uma vez que estas aumentam a expressão de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular.

Vale comentar, que os mecanismos de percepção e transdução de sinais na célula são similares, porém, o programa molecular pode ser sinalizado por diferentes mecanismos. Uma vez que o glifosato aumenta a síntese de receptores proteicos da membrana plasmática e estes promovem um aumento da taxa de transcrição ou alteração no padrão de transcrição dos genes, pode-se sugerir que a ativação dos genes responsáveis pela característica espiguetas agrupadas em arroz seja a partir deste mecanismo celular. Portanto, essa compreensão reforça a ideia de que genes já presentes na espécie, porém, inativos, podem ser expressos por meio de elicitores, neste caso, o glifosato, justificando a presença do fenótipo nas plantas descentendes.

Com os resultados deste trabalho ficou evidente que a deriva de glifosato é eficiente como indutor da característica espiguetas agrupadas em arroz nos estádio R0 e R1. No entanto, não agrega maior número de grãos por panículas, não contribui com o aumento do tamanho da panícula e não reduz o espaçamento entre grãos.

A discussão a cerca dos resultados apresentados ficou um pouco prejudicada pois não existe na literatura nenhuma referência com arroz e/ou outra gramínea que trate do glifosato como indutor da característica espiguetas agrupada.

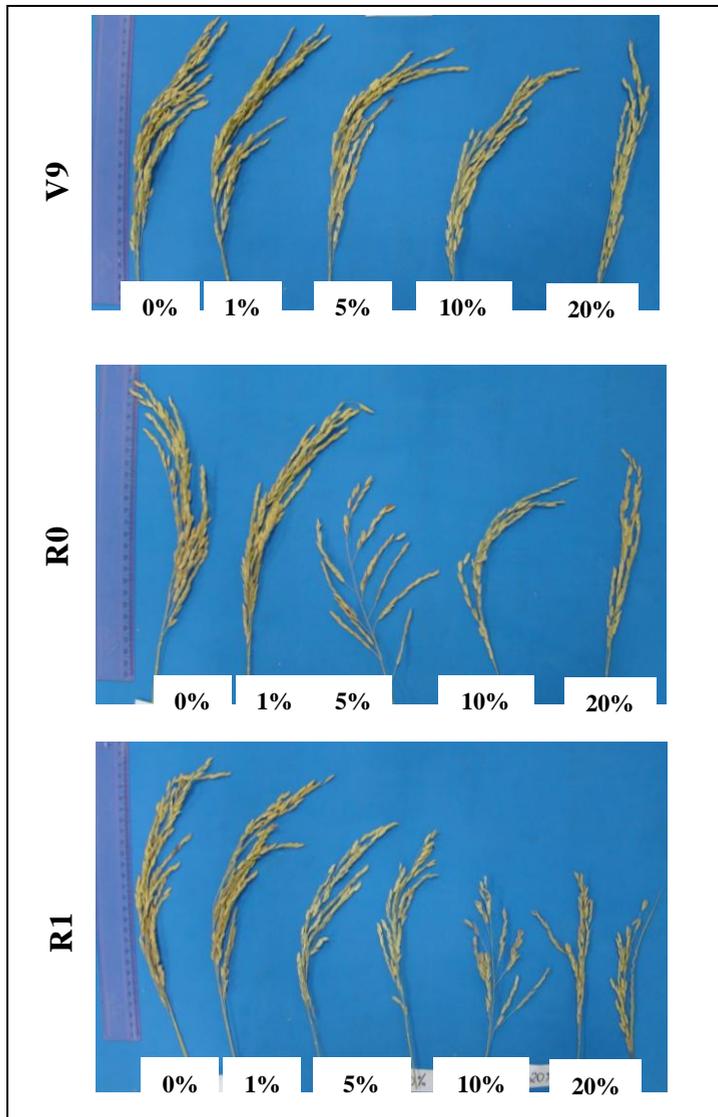


Figura 20. Panículas de arroz da cultivar SCS117 CL em três estádios de desenvolvimento (V9, R0 e R1) após aplicação de 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha) de glifosato.

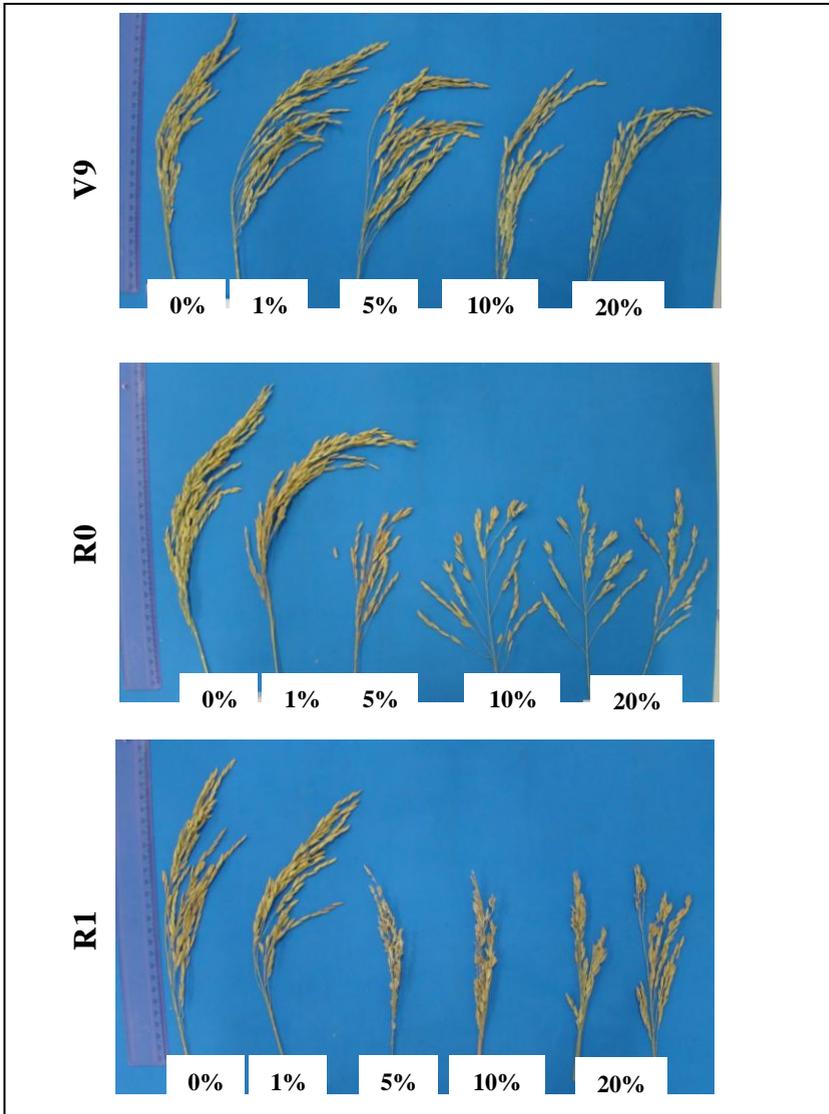


Figura 21. Panículas de arroz da variedades SC 450 CL em três estádios de desenvolvimento (V9, R0 e R1) após aplicação de 1, 5, 10 e 20% da dose comercial (3 L/ha) de glifosato.

CONCLUSÕES

A exposição, mesmo que causada por deriva, de glifosato pode induzir a expressão da característica espiguetas agrupadas em arroz nos estádios reprodutivos R0 e R1.

Os resultados obtidos permitem levantar a hipótese de que o glifosato atue no sítio de atuação do hormônio citocinina, e que este, por sua vez, direta ou indiretamente, controle a expressão da característica espiguetas agrupadas. Esta hipótese poderá ser testada futuramente.

CAPÍTULO V

Conclusões Gerais

Os resultados da presente tese permitem concluir que:

- ✚ A característica espiguetas agrupadas em arroz é de base qualitativa, sendo que este gene deve sofrer efeito de epistasia de um segundo gene, e ambos são ligados em repulsão por 30 cM sendo a interação alélica de co-dominância;
- ✚ O marcador RM 20330 foi eficiente para identificar os genótipos portadores do fenótipo espiguetas agrupadas da Epagri e também da Embrapa. Já o SSR RM 6446 não é polimórfico para a característica em questão, portanto, não é um marcador;
- ✚ A característica espiguetas agrupadas não contribuiu significativamente para a melhoria dos componentes de rendimento para as linhagens de arroz avaliadas.
- ✚ Dentro do quisito curiosidade, constatou-se que a exposição de glifosato, mesmo que causada por deriva, pode induzir a expressão da característica espiguetas agrupadas em arroz nos estádios reprodutivos R0 e R1.

CAPÍTULO VI

Considerações para o melhoramento genético de arroz irrigado

A característica espiguetas agrupadas em arroz irrigado sempre despertou muita expectativa em toda cadeia produtiva orizícola catarinense, desde a sua descoberta em 1997 pela Epagri-EEI.

De 1997 a 2012 o projeto arroz da Epagri-EEI através do melhoramento genético realizou 385 cruzamentos envolvendo a característica espiguetas agrupadas. Entre estes 385 cruzamentos, 185 ainda estão sendo avaliados em gerações segregantes.

A partir destes cruzamentos foi possível obter 31 linhagens que chegaram a ser avaliadas em ensaios regionais. Estas linhagens foram fenotipadas com panículas do tipo 1, 2 e 4. Nenhuma das linhagens com agrupamento das espiguetas (Tipo 1 e 2) mostrou potencial em produtividade, e além disso, sempre se mostravam com baixa qualidade de grãos e suscetibilidade a brusone.

Com o cruzamento Epagri 108/Multiespigueta//RCN-B-93-83 obteve-se a linhagem SC 421, a qual foi lançada como cultivar em 2010, nomeada de SCS116 Satoru. No entanto, mostrou-se promissora a ser lançada como cultivar sendo fenotipada como do tipo 4 (simples), ou seja, sem agrupamento das espiguetas.

Como não foi possível corresponder a expectativa criada de alcançar produtividades em torno de 14 t/ha ao longo destes 16 anos, muitas lacunas foram abertas, muitas dúvidas foram surgindo sobre o mecanismo genético desta característica, inclusive sobre as possíveis rotas metabólicas envolvidas, e de que forma este fenótipo contribui com os fatores de rendimento. Procurando responder a essas questões, foi desenvolvida a presente tese, que se constitui no primeiro estudo mais aprofundado sobre a característica espiguetas agrupadas.

O conhecimento sobre as bases genéticas envolvidas com a característica em questão, são informações geradas nesta tese que servirão de base para futuros trabalhos de melhoramento genético.

A comprovação da aproximação do marcador SSR RM 20330 ao gene da característica de interesse é fundamental e serve de base para trabalhos futuros de mapeamento genético, seleção assistida por marcadores e sintenia com outras espécies.

De grande importância ao melhoramento genético deste cereal, é o conhecimento oferecido por esta tese sobre o fato de que a característica espiguetas agrupadas não contribui significativamente com incrementos nos componentes de rendimento. É possível contribuir com o melhoramento genético de arroz afirmando ser dispensável trabalhar com a característica espiguetas agrupadas na busca por saltos em produtividade. Talvez, melhorias no processo fisiológico da planta de arroz possa ser fator prioritário no processo evolutivo desta espécie para que a planta tenha condições de oferecer alta densidade de grãos na panícula. Em outras palavras, seria preciso maiores estudos a cerca da genética e fisiologia envolvida na expressão da característica.

Com o estudo de deriva de glifosato, comprovando que este herbicida provoca a expressão da característica espiguetas agrupadas especificamente em estádios reprodutivos do arroz, podem servir de base para levantar a hipótese de que teores endógenos de citocininas podem influenciar a expressão do fenótipo em questão.

Finalmente, tão ou mais relevantes do que os resultados obtidos, dúvidas e outras perguntas ainda sem respostas são importantes de serem perseguidas para o benefício do melhoramento genético e manejo do cultivo do arroz, um valioso recurso genético da humanidade.

BIBLIOGRAFIA

ANGLADETTE, A. **El arroz**. Madri: Blume, 1969. 867 p.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

ARUMUNAGATHAN, K.; EARL, E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Mol Bio** v.9 : 208-218

ASHIKARI, M.; SAKAMOTO, T. Rice yielding and plant hormones. In: HIRANO, H-Y.; HIRAI, A.; SANO, Y.; SASAKI, T. **Rice biology in the genomic era**. Springer: Berlin, v. 62, 2008, p. 309-320.

ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; YAMAMOTO, T.; TAKASHI, T.; NISHIMURA, A.; ANGELES, E.R.; QIAN, Q.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Cytokinin oxidase regulates Rice grain production. **Science**, v. 309, p. 741-745, 2005.

ATROCH, A.L.; NUNES, G.H.S. Progresso genético em arroz de várzea úmida no Estado do Amapá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**., Brasília, v.35, n.4, p.767-771, 2000.

BAENZIGER, P.S.; RUSSEL, W.K.; GRAEF, G.L.; CAMPBELL, B.T. Improving Lives: 50 years of Crop Breeding, Genetics, and Cytology (C-1). **Crop Sci.**, v.46, p.2230-2244, 2006.

BOHM, G.M.B.; GENOVESE, M.I.; PIGOSSO, G.; TRICHEZ, G.; ROMBALDI, C.V. Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.28, Dec., p. 192-197, 2008.

BOTSTEIN D; WHITE RL; SKOLNICK M; DAVIS RV. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, v.32, p.314-331 1980.

BOUDET, A.M.; GRAZIANA, A.; RANJEVA, R.I. In: VAN SUMERE, C.F.; LEA, P.J. **The biochemistry of plant phenolics.**, Oxford: Clarendon Press, 1985, 135 p.

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

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

CAIXETA, E.T. **Caracterização da resistência genética à mancha-angular e desenvolvimento de marcadores microsatélites para regiões específicas do genoma do feijoeiro**. 2002, 90 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CAO, L.Y.; WU, J.L.; FAN, Y.Y.; CHENG, S.H.; ZHUANG, J.Y. QTL analysis for heading date and yield traits using recombinant inbred lines of indica rice grown in different cropping seasons. **Plant Breeding**. V. 129, p. 676-682, 2010.

CARBONARI, C.A.; MESCHEDE, D.K.; VELINI, E.D. Efeito da aplicação de glifosato no crescimento inicial de mudas de eucalipto submetidas a dois níveis de a dubação fosfatadas. I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLIFOSATO, 2007, **Anais...** p. 68-70, 2007.

CASTRO, P.R.C.; MESCHEDE, D.K. Glyphosate: Uso como maturador em cana-de-açúcar. In: VELINI, E.D.; MESCHEDE, D.K.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE, M.L.B. **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009, p. 429-444.

COFFMANN, W.R.; HERRERA, R.M. Rice. In: FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. (Ed.) **Hibridization of crop plants**. Madison:

American Society of Agronomy and Crop Science Society of American, 1980, p. 511-522.

COLOMBARI FILHO, J.M.; DURÃO, R.S.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E.; MENDONÇA, J.A.; VIDOTTI, M.S. Avaliação de progênies derivadas de cruzamentos envolvendo o acesso com espiguetas agrupadas da Embrapa. In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 8, 2013, Santa Maria: UFSM. **Anais...** p. 117-120, 2013.

CORDEIRO, A.C.C. **Número de inter cruzamentos na eficiência da seleção recorrente na cultura do arroz.** Lavras: UFLA, 2001. 149 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, 2001.

CREGAN, P.B.; JARVIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VAN TOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, v. 39, p. 1464-1490, 1999.

CRUZ, C.D. **Programa Genes.** Viçosa: UFV, 2006.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1990.

DUKE, S. O. et al. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 340-344, 2003.

DURÃO, R. da S. **Mapeamento genético de região genômica associada ao controle de arquitetura de panícula de arroz (*Oryza sativa* L.).** 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, DF.

EBERHARDT, D.S.; SCHIOCCHET, M.A. **Recomendações para a produção de arroz irrigado em Santa Catarina (Sistema pré-germinado)**. Florianópolis: Epagri, 2012, 83p.

EPAGRI. **Sistema de produção de arroz irrigado em Santa Catarina**. 2 ed. Florianópolis, 2005. 87 p. (Epagri. Sistema de Produção, 32).

EPAGRI. **A cultura do arroz irrigado – Sistema pré-germinado**. Florianópolis, 2002, 273p.

FAHLIANI, R.A.; KHODAMBASCHI, M.; HOUSHMAND, S.; ARZANI, A. Heritability for some agronomic characters of rice (*Oryza sativa* L.) and theirs linked microsatellites identification. **Turk. Agric.**v.35, p.481-490, 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. EMBRAPA, 2º Ed, 1998.

FIDELIS, R.R. **Capacidade de combinação de cultivares locais e melhoradas de milho sob estresse de baixo nitrogênio**. 2003. 90f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa.

FOSKET, D.E. **Plant growth and development: A molecular approach**. Academic Press: California, v. 1, 580 p, 1994.

FU, J.; XU, Y.; CHEN, L.; YUAN, L.; WANG, Z.; YANG, J. Changes in the activity of enzymes involved in starch synthesis and hormone concentrations in upper and lower spikelets and their association with grain filling “head rice”. **Rice Science**. V. 20, p. 120-128, 2013.

FUTUYMA, D.J. **Evolution**. State University of New York at Stony Brook, 3ed. 656 p. 2013.

GALLI, J. Origen, distribuição e domesticação do arroz. **Lavoura Arrouzeira**, Porto Alegre, v. 31, n. 307, p. 63-68, 1978.

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TAECHINI, R.; KOMJANC, M.; GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 1069-1076, 1998.

GODOY, M.C. **Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção do fósforo pela soja**. 2007. 43p. Dissertação (Mestrado em Agricultura). Faculdade de Ciências agrônômicas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu-SP.

GOFF, S.A.; RICKE, D. LAN, T.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. Ssp. *Japonica*). **Science**, v. 296, 2002, p. 92-100.

GONZÁLES, J.F. Origen, taxonomia y anatomia de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.). In: TASCÓN, E.J.; GARCÍA, E.D. **Arroz: Investigación y Producción**. CIAT: Colombia, 1985, p. 45-80.

GRAMENE. Disponível em www.gramene.org Acessado em: 08 de dezembro de 2008 e fevereiro de 2013.

GREGORIO, G.B.; SENADHIRA, D. Genetic analysis of salinity tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 86, p. 333-338, 1993.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. **Aust. J. Biol.**, v. 9:p. 463-493, 1956.

GRIST, D.H. **Rice**. 5 ed. Londres: Longman, 1978, 601p.

HUANG, X.; QIAN, Q.; LIU, Z.; SUN, H.; HE, S.; LUO, D.; XIA, G.; CHU, C.; LI, J.; FU, X. Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. **Nature Genetics**, v. 41, p. 494-497, 2009.

ICEPA **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**. v.1 1976 - Florianópolis: Epagri/Cepa, 2011-2012, 2012, 182 p.

IKEDA, M.; HIROSE, Y.; TAKASHI, T.; SHIBATA, Y.; YAMAMURA, T.; KOMURA, T.; DOI, K.; ASHIKARI, M.;

MATSUOKA, M.; KITANO, H. Analysis of rice panicle traits and detection of QTLs using an image analysing method. **Breeding Science**, v. 60, p. 55-64, 2010.

KHUSH, G.S. Modern Varieties – Their real contribution to food supply and equity. **GeoJournal**, v. 35, p. 275-284, 1995.

KHUSH, G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1/2, p. 25-34, sept. 1997.

KWON SJ, CHO YCH, KWON SW, OH CS, SUH JP, SHIN YS, KIM YG, HOLLIGAN D, WESSLER SR, HWANG HG, AHN SN. QTL mapping of agronomic traits using an RIL population derived from a cross between temperate japonica cultivars in rice (*Oryza sativa* L.). **Breeding Sci** 58: 271-279, 2008.

KONISHI, S.; ISAWA, T.; LIN, S.Y.; EBANA, K.; FUKUTA, Y.; SASAKI, T.; YANO, M. An SNP Caused Loss of Seed Shattering During Rice Domestication. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1392-1396, 2006.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular and Biology Evolution**, v. 4, p. 203-221, 1987.

LI, C.; ZHOU, A.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**, v. 311, n. 5769, p. 1936-1939, 2006.

LIANG, G.; ZHEN-HUA, Z.; JIE-YUN, Z. Quantitative trait loci for heading date and their relationship with genetic control of yield traits in rice (*Oryza sativa*). **Rice Science** v.20, p. 1-12, 2013.

LIU, T.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; XING, Y. Quantitative trait loci for the number of grain per panicle dependent on or independent of heading date in rice (*Oryza sativa* L.). **Breeding Science**, v. 61, p. 142-150, 2011.

LIU, Z.W.; BIYASHEV, R.M.; MARROF, M.A.S. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 869-876, 1996.

LOPES, S.I.G. Avaliação dos parâmetros genéticos da população de arroz irrigado CNA 11 e da divergência genética entre os genitores. UFRGS, 2002. 112 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

LOPES, S.I.G., LOPES, M.C.B., et al. Avaliação do ganho genético do programa de melhoramento do Irga no período de 1961 a 2004. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4, 2005. Anais... Santa Maria: Orium, p. 67-69, 2005.

MARSCHALEK, R.; ROZZETO, D.; STUKER, H.; SCHIOCCHET, M.A.; VIEIRA, J.; NOLDIN, J.A.; EBERHARDT, D.S.; ANDRADE, A.A.; WICKERT, E.; SCHEUERMANN, K.K.; SANTOS, S.B.; PORTO, G. Estimativa de ganho genético obtido pela adoção das cultivares de arroz irrigado da Epagri em Santa Catarina, Brasil. **Trabalho submetido ao Congresso Brasileiro de Melhoramento Genético, 2013.**

MARSCHALEK, R.; VIEIRA, J.; ISHIY, T.; SCHIOCCHET, M.; BACHA, R.E. Melhoramento genético de arroz irrigado em Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, v.21, n. 3, p. 54-57, 2008.

MATSUO, O.T.; KUMAZAWA, K.; ISHII, R.; ISHIHARA, K.; HIRATA, H. **Science of the rice plant**. V. 2, Ed. Food and Agriculture Policy Research Center, 1995, p. 189-198.

McCOUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 89-99, 1997.

McCOUCH, S.R.; TEYTELMAN, L.; XU, Y.; LOBOS, K.B.; CLARE, K.; WALTON, M.; FU, B.; MAGHIRANG, R.; LI, Z.; XING, Y.; ZHANG, Q.; KONO, I.; YANO, M.; FJELLSTROM, R.; DeCLERCK,

G.; SCHNEIDER, D.; CARTINHO, S.; WARE, D.; STEIN, L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research**, v. 9, p. 199-207, 2002.

McGAW, B.A.; BURCH, L.R. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones – physiology, biochemistry and molecular biology**. 2 Ed. London: Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 98-117.

MESCHEDE, D.K.; CARBONARI, C.A.; VELINI, E.D. Aspectos nutricionais da cana-de-açúcar em decorrência da aplicação de maturadores. I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLIFOSATO, 2007, **Anais...** p. 289-292, 2007.

MÉTAIS, I.; HAMON, B.; JALOUZOT, R.; PELTIER, D. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1346-1352, 2002.

MIRANDA FILHO, J.B.; NASS, L.L. Hibridação no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.) **Recursos Genéticos & Melhoramento**. Rondonópolis. 2001. p. 603-628.

MIURA, K.; IKEDA, M.; MATSUBARA, A.; SONG, X-J.; ITO, M.; ASANO, K.; MATSUOKA, M.; KITANO, H.; ASHIKARI, M. OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. **Nature genetics**, v.42, p. 545-549, 2010.

MONTÁLVAN, R. **Mutação induzida**. In: DESTRO, D.; MONTÁLVAN, R. Melhoramento genético de plantas. UEL: Londrina, PR, 1999, p. 39-56.

MORAIS, O.P. de **Análise multivariada da divergência genética dos progenitores, índices de seleção e seleção combinada numa população de arroz oriunda de inter cruzamentos, usando macho-esterilidade**. Viçosa: UFV, 1992. 251 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, 1992.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.

MOURA NETO, F.P.; LOPES, S.I.G.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.M.; MORAES, O.P. Contribuição da pesquisa de melhoramento genético para elevação da produtividade da lavoura arrozeira do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 7. **Anais...** Balneário Camboriú: Epagri, p. 248-251, 2011.

MOURA NETO, F.P.; MARCHESAN, E.; LOPES, S.I.G.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.M. Ganho genético em potencial produtivo do arroz irrigado no Rio Grande do Sul, após o lançamento da cultivar BR-Irga 409. In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 6. **Anais...** Porto Alegre: Palloti, 2009.CD-Rom.

PANAUD, O.; CHEN, X.; McCOUCH, S.R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Mol. Gen. Genet.**, v. 252, p. 597-607, 1996.

PEREIRA, J.A. **Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história.** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002, p. 17-26.

RALLO, P.; DORADO, G.; MARTÍN, A. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 984-989, 2000.

RANGEL, P.H.N.; GUIMARÃES, E.P.; NEVES, P.C.F. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, n.5, p. 349-347. 1996.

RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, C.; FERREIRA, M.E.; RANGEL, P.N.; BRONDANI, R.P.V. **Utilização de espécies silvestres *Oryza glumaepatula* no pré-melhoramento de arroz.** Brasília, DF:Embrapa, 2006, p. 94-98 (Documentos 185).

RODER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M.; LEROY, P.; GANAL, M.W. A microsatellite map of wheat. **Genetics**, v. 149, p. 2007-2023, 1998.

SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M.; SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeats markers development from maize sequences found in the GenBank database: map construction. **Crop Science**, v. 36, p. 1676-1683, 1996.

SHARON, A.; AMSELLEM, Z.; GRESSEL, J. Glyphosate suppression of an elicited defense response. Increased susceptibility of *Cassia obtusifolia* to a Mycoherbicide. **Plant Physiology**, Washington, v.98, p. 654-659, 1992.

SHOMURA, A.; IZAWA, T.; EBANA, K.; EBITANI, T.; KANEGAE, H.; KONISHI, S.; YANO, M. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. **Nature Genetics**, v.40, p.1023-1028, 2008.

SOARES, A.A.; RAMALHO, M.A.P.; SOUSA, A. F. Estimativa do progresso genético obtido pelo programa de melhoramento de arroz irrigado da EPAMIG, na época de oitenta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n.1, p. 97-104, 1994.

TAGUCHI-SHIOBARA, F.; KAWA-GOE, Y.; KATO, H.; ONODERA, H.; TAGIRI, A.; HARA, N.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; KITANO, H.; YANO, M.; TOKI, S. A loss-of-function mutation of rice “dense panicle 1” causes semi-dwarfness and slightly increases number of spikelets. **Breeding Science**, v. 61, p. 17-25, 2011.

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

VALENTINI, A.P.F. **Análise genética do caráter nuda em panículas de aveia hexaploide**. UFRGS, 2012. 75 f. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

VAUGHAN, D. A.; BALÁZS, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. From Crop Domestication to Super-domestication. **Annals of Botany**, v.100, p.893–901, 2007.

VAUGHAN, D.A.; KADOWAKI, K.; KAGA, A.; TOMOOKA, N. On the phylogeny and biogeography of the genus *Oryza*. **Breeding Science**. v. 55, p. 113-122, 2005.

VAUGHAN, D.A.; MORISHIMA, H. Biosystematics of the genus *Oryza*. In: SMITH, C.W.; DILDAY, R.H. **Rice. Origin, History, Technology and Production**. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey. p. 27-65, 2003.

VELINI, E.D.; DUKE, S.O.; TRINDADE, M.L.B.; MESCHEDE, D.K.; CARBONARI, C.A. Modo de ação do Glyphosate. In: VELINI, E.D.; MESCHEDE, D.K.; CARBONARI, C.A.; TRINDADE, M.L.B. **Glyphosate**. Botucatu: FEPAF, 2009, p. 113-133.

VIEIRA, J. **Caracterização morfológica e molecular do banco de germoplasma de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) da Epagri**. 2007. 128f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, SC.

VIEIRA, J.; MARSCHALEK, R.; ISHIY, T.; SCHIÖCCHET, M.A.; APPIO, K.T. A hibridação no melhoramento genético do arroz irrigado em Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**. v.20, n.2, p.43-6, jul. 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J. et al. AFLP – a new technique for DNA-fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23: 4407-4414, 1995.

WANG, W.; XIA, H.; YANG, X.; XU, T.; JIANG, H.; CAI, X.X.; WANG, F.; SU, J.; SNOW, A.A.; LU, B. A novel 5-

enolpyruvoylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase transgene for glyphosate resistance stimulates growth and fecundity in weedy rice (*Oryza sativa*) without herbicide. **New Phytologist**, Research, p. 1-10, 2013.

WATANABE, Y. Genomic constitution of Genus *Oryza*. In: MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. (Ed.) **Science of the rice plant**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v. 3, p. 29-68.

WEISING, K.; NYBON, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. **DNA fingerprint in Plants: principles, methods, and applications**. 2nd. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005. 444p.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers re useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.6531-6535, 1990.

XU, Y.; MCCOUCH, S.; ZHANG, QIFA. 2005. How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? **Plant Molecular Biology**. V. 59, p.7-26.

XU, J.F.; WEI, X.J.; JIANG, L.; LU, G.W.; WANG, H.J.; ZHOU, Z.L.; WAN, J.M.; Genetic analysis of heading date of some early season indica rice cultivars and hybrid rice parents in China. **Rice Science**. V. 24, p. 215-222, 2008.

YAN, W.H.; WANG, P.; CHEN, H.X.; ZHOU, H.J.; LI, Q.P.; WANG, C.R.; DING, Z.H.; ZHANG, Y.S.; YU, S.B.; XING, Y.Z.; ZHANG, Q.F. A major QTL, *Ghd8*, plays pleiotropic role in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. **Molecular Plant**. V. 4, p. 319-330.

YOKOYAMA, S.; BACHA, R.E.; ISHIY, T. Multi-espiguetta, genótipo em potencial para uso em melhoramento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO 1 e REUNIÃO DA CULTURA

DO ARROZ IRRIGADO, 23., 1999, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999, p. 111.

YU, K.; PARK, S.L.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeats (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, v. 91, p. 429-434, 2000.

YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G.K.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J.; SUN, J.; TANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, X.; LIN, W.; YE, C.; TONG, W.; CONG, L.; et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. Ssp. *Indica*). **Science**, v. 296, 2002, p. 79-91.

ZENG, Y.; ZHANG, H.; LI, Z.; SHEN, S.; SUN, J.; WANG, M.; LIAO, D.; LIU, X.; WANG, X.; XIAO, F., WEN, G. Evaluation of genetic diversity of rice landraces (*Oryza sativa* L.) in Yunnan, China. **Breeding Science**, v. 57, p. 91-99. 2007.

ZHENG, L.; ZHU, X.; QIAN, Q.; ZHAO, Z.; ZHANG, J. HU, X.; LIN, H.; LUO, D. Morphology and mapping analysis of rice (*Oryza sativa* L.) clustered spikelets (Cl) mutant. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n. 6, p. 559-562, 2003.