**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade genética em germoplasma de arroz japonês utilizando
marcadores moleculares e agromorfológicos**

Fátima Bosetti

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2012**

Fátima Bosetti
Engenheira Agrônoma

**Diversidade genética em germoplasma de arroz japonês utilizando marcadores
moleculares e agromorfológicos**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ BALDIN PINHEIRO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Bosetti, Fátima

Diversidade genética em germoplasma de arroz japonês utilizando marcadores
moleculares e agromorfológicos / Fátima Bosetti. - Piracicaba, 2012.
183 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Arroz 2. Diversidade genética 3. Germinação 4. Germoplasma vegetal
5. Marcador molecular I. Título

CDD 633.18
B743d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Hermes e Beatris, por tudo o que fizeram pela minha formação, pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Ao meu irmão, Ezequiel, pelo ombro amigo de sempre.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela benção da vida, por cada dia e cada experiência.

Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro pela acolhida e orientação, e mais do que isso, pela paciência, amizade, abertura e exemplo profissional.

À Prof^a. Dr^a. Maria Imaculada Zucchi pelas contribuições, incentivo, amizade e disponibilidade em ajudar sempre.

À Prof^a. Dr^a. Ana Dionísia Novembre e à Helena Pescarin Chamma pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Sementes e auxílio nos experimentos de caracterização de tolerância ao frio.

Aos professores, colegas e funcionários do departamento de Genética, em especial ao Márcio Araújo Silva, Domingos de Salvio Amaral e Cláudio Roberto Segatelli pela ajuda nos experimentos de campo e sempre que necessário.

Ao Dr. Alisson Fernando Chiorato e à Dr. Aluana Gonçalves de Abreu pelo auxílio e discussões de análise de dados.

A cada um dos colegas do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento pela convivência nesses cinco anos, amizade, troca de ideias, ajudas, momentos de descontração, por tudo.

À Camila Montebelli pelas constantes ajudas na implantação e avaliação dos experimentos, estendendo o agradecimento para Thiago, Glauber, Carlos, Michelle, Milene, Carlos Eduardo, Talita, Jake, Natália, Keila e Mariza, e a cada um que, mesmo não citado aqui, auxiliou em algum momento. Muito Obrigada!

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e ao Departamento de Genética pelo ensino de qualidade.

Ao CNPq e à Capes pelos períodos de bolsa de estudos concedida.

À FAPESP pelo financiamento deste trabalho (processo n° 2007/06615-6).

À Embrapa Arroz e Feijão pelo fornecimento de sementes dos genótipos utilizados como padrões nas análises de diversidade molecular.

À Pioneer Hi-Bred International Inc. pelo auxílio financeiro e à Dr.^a Sandra Cristina Kothe Milach, ao Dr. Charlie Messina e Dr. Zhanshan Dong pelo incentivo e exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos meus pais, Hermes e Beatris, por acreditarem e sem medir esforços me apoiarem em cada passo. Ao meu irmão, Ezequiel, pelas conversas e discussões.

À todos os familiares e amigos pelas palavras de incentivo e carinho.

À todos que colaboraram para a realização desse trabalho. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO.....	23
Referências	26
2 DIVERSIDADE FENOTÍPICA EM GERMOPLASMA DE ARROZ JAPONÊS.....	31
Resumo	31
Abstract	31
2.1 Introdução	32
2.2 Material e Métodos	35
2.2.1 Instalação e condução dos experimentos	35
2.2.2 Caracterização e avaliação dos acessos	36
2.2.2.1 Descritores utilizados no ano agrícola 2007/2008.....	36
2.2.2.2 Descritores utilizados no ano agrícola 2008/2009.....	38
2.2.3 Análise de dados.....	39
2.2.3.1 Estatísticas descritivas, análise univariada e estimativa de parâmetros	39
2.2.3.2 Análises multivariadas.....	40
2.3 Resultados	43
2.3.1 Características avaliadas no ano agrícola 2007/2008.....	43
2.3.2 Características avaliadas no ano agrícola 2008/2009.....	58
2.3.3 Análises considerando os dois anos de avaliação	60
2.4 Discussão.....	63
Referências	70
3 DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR EM GERMOPLASMA DE ARROZ JAPONÊS UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ANÔNIMOS E EXPRESSOS (SSRs E EST-SSRs)	75
Resumo	75
Abstract	75
3.1 Introdução	76
3.2 Material e Métodos.....	78

3.2.1 Material vegetal.....	78
3.2.2 Extração de DNA e Genotipagem com marcadores SSR.....	79
3.2.3 Análise de dados	81
3.3 Resultados	82
3.3.1 Diversidade detectada pelos marcadores SSRs.....	82
3.3.2 Análises de agrupamento e estrutura populacional	88
3.4 Discussão	99
Referências.....	105
4 VARIABILIDADE PARA TOLERÂNCIA AO FRIO NA GERMINAÇÃO EM GERMOPLASMA DE ARROZ DE ORIGEM JAPONESA.....	111
Resumo	111
Abstract.....	111
4.1 Introdução.....	112
4.2 Material e Métodos	115
4.2.1 Material Vegetal.....	115
4.2.2 Avaliação da tolerância ao frio.....	115
4.2.3 Análise de dados	119
4.3 Resultados	121
4.3.1 Experimento I: Germinação a 13°C e 28°C.....	121
4.3.2 Experimento II: Germinação em gradiente de temperaturas.....	130
4.3.3 Experimento III: Tolerância ao frio na fase de germinação-emergência e desenvolvimento inicial.....	138
4.4 Discussão	140
Referências.....	146
5 OBTENÇÃO DE UMA COLEÇÃO NUCLEAR DE ACESSOS JAPONESES DE ARROZ	151
5.1 Introdução.....	152
5.2 Material e Métodos	155
5.2.1 Dados fenotípicos e moleculares usados na obtenção da coleção nuclear...	155
5.2.2 Obtenção e representatividade da coleção nuclear	155
5.3 Resultados	158
5.3.1 Coleção nuclear.....	158
5.3.2 Comparação de propriedades fenotípicas	159
5.3.3 Comparação de propriedades moleculares	165

5.3.4 Representação espacial da diversidade da coleção inteira e da coleção nuclear	166
5.4 Discussão.....	167
Referências	171
6 CONCLUSÕES.....	175
ANEXOS	177

RESUMO

Diversidade genética em germoplasma de arroz japonês utilizando marcadores moleculares e agromorfológicos

A caracterização e o entendimento da diversidade e estrutura genética de acessos armazenados em bancos de germoplasma é importante para a sua efetiva utilização em programas de melhoramento. Neste trabalho, 192 acessos japoneses de arroz pertencentes ao Banco de Germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ/USP foram caracterizados por 23 descritores agromorfológicos (13 variáveis contínuas e dez variáveis categóricas) e 24 marcadores microssatélites (12 SSRs genômicos e 12 EST-SSRs). As variáveis contínuas que apresentaram maior contribuição para a variabilidade entre os acessos foram avaliadas novamente em um segundo experimento para considerar os efeitos de interação genótipo por ano na diversidade. Os acessos apresentaram variabilidade para ambos os tipos de variáveis, e o tipo de variável utilizada na avaliação e a interação genótipo por ano implicaram em diferentes padrões de agrupamento entre os acessos, sendo que o agrupamento mais consistente foi o realizado considerando todas as variáveis e os dois anos agrícolas. Os 24 marcadores microssatélites detectaram um total de 181 alelos, 38 dos quais foram exclusivos. A média do número de alelos por loco foi de 7,54 e a diversidade gênica foi de 0,59 para os SSRs genômicos e de 0,46 para os EST-SSRs. As análises caracterizaram os acessos japoneses como 98,4% pertencentes à subespécie Japônica. A resposta dos acessos para estresse por frio na germinação foi avaliada em três experimentos; I: os 192 acessos e três testemunhas tolerantes foram avaliados sob duas condições: 13°C por 28 dias (estresse por frio) e 28°C por sete dias (condições ótimas); II: dezessete acessos selecionados entre os que apresentaram melhores desempenhos na temperatura de 13°C foram avaliados juntamente com as três testemunhas em gradiente de temperatura de 11°C, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C para estudar a interação genótipo por temperatura; III: os genótipos do experimento II foram avaliados para germinação e estabelecimento inicial de plântulas a 15°C em areia. A diminuição da temperatura teve efeito significativo no desempenho dos acessos, e a interação genótipo por temperatura foi significativa para comprimento do coleóptilo e índice de velocidade de germinação. Entre os acessos estudados foi observada variação genética para as características relacionadas com a germinação em baixa temperatura e encontraram-se acessos com reduções nos comprimentos de coleóptilo e radícula devido ao frio comparáveis com a das testemunhas, embora com velocidade de crescimento menor, inclusive em temperatura ótima. Uma coleção nuclear constituída por 52 acessos e representativa da diversidade fenotípica e molecular observada nos 192 acessos foi obtida.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; Germoplasma; Descritores agromorfológicos; Marcadores microssatélites; Tolerância ao frio; Coleção nuclear

ABSTRACT

Genetic diversity of Japanese rice germplasm using molecular markers and agromorphological traits

Germplasm characterization and the knowledge of its diversity and population structure are important to effective utilization of genetic resources in breeding programs. In this work, 192 Japanese rice accessions maintained at Germplasm Bank of Genetics Department at ESALQ/USP were characterized using 23 agromorphological descriptors (13 continuous and ten categorical variables) and 24 SSR markers (12 genomic SSRs and 12 EST-SSRs). The continuous variables presenting more contribution in the divergence among accessions were evaluated again in a second harvest year to account interaction between genotype and year in the diversity. Japanese accessions presented variability for continuous and categorical variables and the type of variable and the genotype by year interaction resulted in a different pattern of clustering of accessions. The most consistent cluster was that considering both continuous and categorical variables and the two harvest years. A total of 181 alleles were detected by the microsatellite markers, 38 of them were private. Allele per locus mean was 7.54 and gene diversity was 0.59 for genomic SSRs and 0.46 for EST-SSRs. Accessions were classified as 98.4% belonging to japonica subspecies. Accessions response to cold stress at the germination was evaluated in three experiments; I: 192 accessions and three cold-tolerant controls were evaluated under two conditions: 13°C during 28 days (cold stress) and 28°C during seven days (optimal temperature); II: seventeen accessions selected among those presenting better performance in the first experiment were evaluated along with three cold-tolerant controls under five temperatures: 11°C, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C to study genotype by temperature interaction; III: germination and plantule initial development in sand at 15°C of genotypes used in the second experiment were evaluated. It was detected variability among the accessions to germination under cold stress. Temperature decrease had significant effect for germination velocity index and coleoptile and radicle length, and the interaction between genotype and temperature was significant for germination velocity index and coleoptile length. The accessions presented genetic variability for cold tolerance germination and accessions presenting coleoptile and radicle reductions due to cold comparable with cold-tolerant controls were detected. A core collection containing 52 accessions representing the phenotypic and molecular diversity of the 192 accessions was obtained.

Keywords: *Oryza sativa*; Germplasm; Agromorphological descriptors; Microsatellite markers, Cold tolerance; Core collection

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Visão do experimento conduzido no campo experimental do departamento de Genética da ESALQ/USP no ano agrícola 2007/2008 para caracterização agromorfológica de 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz	36
Figura 2.2 - Exemplo de diferenças observadas para arista em acessos japoneses de arroz.....	45
Figura 2.3 - Distribuição de frequência de 12 características avaliadas como variáveis contínuas no ano agrícola 2007/2008 em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas.....	46
Figura 2.4 - Exemplo de valores extremos observados entre 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz: a) altura de planta 70 dias após a semeadura e na maturidade ; b) característica de panícula e de grãos.....	50
Figura 2.5 - Distribuição de 192 acessos japoneses de arroz e de seis cultivares brasileiras de arroz (testemunhas) identificada pelos escores dos genótipos para as duas primeiras variáveis canônicas	53
Figura 3.1 - Frequências alélicas para marcadores SSRs genômicos utilizados no estudo de diversidade genética entre 192 acessos japoneses de arroz. O eixo y indica a frequência do alelo (%) e o eixo x o tamanho do alelo (pb)	84
Figura 3.2 - Frequências alélicas para os marcadores EST-SSRs utilizados no estudo da diversidade genética entre 192 acessos japoneses de arroz. O eixo y indica a frequência do alelo (%) e o eixo x o tamanho do alelo (pb)	85
Figura 3.3 - Dendrograma de 11 variedades internacionais de arroz, obtido pelo método de agrupamento UPGMA usando a distância de Rogers-W e baseado em 24 marcadores SSRs.....	89
Figura 3.4 - Análise de coordenadas principais de 11 variedades internacionais de arroz feita com base no complemento da distância de Rogers-W	90
Figura 3.5 - Média dos valores de: a) $\text{LnP}(D)$ de Pritchard et al. (2000) e b) ΔK de Evanno et al. (2005) para cinco repetições de simulações no programa Structure com $k = 1$ a 10 para 11 variedades de arroz	91
Figura 3.6 - Alocação de 11 variedades de arroz em dois grupos (Indica e Japônica) e três grupos (Japônica temperado, Japônica tropical e Indica) identificados na análise da estrutura populacional	91
Figura 3.7 - Dendrograma de 203 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e 11 padrões), construído pela distância de Rogers-W e pelo critério de agrupamento UPGMA. Os 11 padrões são identificados pelas	

ramificações nas cores vermelha (Indica), amarelo (Japônica tropical), verde (Aromático) e azul (Japônica temperado). As três barras alocadas à direita no dendrograma correspondem aos agrupamentos identificados pela análise de estrutura populacional para os valores de $k=2$, $k=4$ e $k=8$	93
Figura 3.8 - Análise de coordenadas principais de 203 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e 11 variedades internacionais) feita com base no complemento da distância de Rogers-W	94
Figura 3.9 - Média dos valores de: a) $\ln P(D)$ de Pritchard et al. (2000) e b) ΔK de Evanno et al. (2005) para cinco repetições de simulações no programa Structure com $k = 1$ a 10 para 192 acessos japoneses e 11 variedades de arroz	95
Figura 3.10 - Alocação de 203 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e 11 variedades utilizadas como padrões) em grupos identificados na análise da estrutura populacional usando o programa Structure para: a) $k=2$, b) $k=4$ e c) $k=8$	97
Figura 4.1 - Representação da parcela experimental no momento da avaliação ...	116
Figura 4.2 - Representação das parcelas e subparcelas correspondentes às cinco temperaturas (11°C, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C, fileiras da esquerda para a direita) e aos vinte genótipos (cada placa de petri conteve um genótipo) avaliados em cada temperatura	117
Figura 4.3 - Representação do experimento de germinação em areia de dezessete acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio	118
Figura 4.4 - Médias dos comprimentos do coleóptilo sob estresse por frio (13°C) e temperatura ótima (28°C) de 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes avaliados para tolerância ao frio na germinação. Linhas verticais e horizontais representam a separação de grupos de médias identificados pelo teste de Scott-Knott a 5%	124
Figura 4.5 - Médias dos comprimentos da radícula sob estresse por frio (13°C) e temperatura ótima (28°C) de 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes avaliados para tolerância ao frio na germinação. Linhas verticais e horizontais representam a separação de grupos de médias identificados pelo teste de Scott-Knott a 5%	125
Figura 4.6 - Médias das reduções nos comprimentos do coleóptilo e da radícula devido ao estresse por frio de 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes avaliados para tolerância ao frio na germinação. Linhas verticais e horizontais representam a separação de grupos de médias identificados pelo teste de Scott-Knott a 5%	126
Figura 4.7 - Distribuição dos 192 acessos japoneses e das três testemunhas tolerantes ao frio conforme os escores para os dois primeiros componentes principais	129

- Figura 4.8 - Médias de acessos japoneses de arroz e de testemunhas tolerantes ao frio para índice de emergência. Letras diferentes indicam que há diferença significativa segundo o teste de Tukey a 5%.....139
- Figura 4.9 - Médias de acessos japoneses de arroz e de testemunhas tolerantes para Altura da plântula (cm) avaliada após 28 dias em temperatura de 15°C. Letras diferentes indicam que há diferença significativa segundo o teste de Tukey a 5%139
- Figura 4.10 - Médias de acessos japoneses de arroz e de testemunhas tolerantes ao frio para Produção de matéria seca (mg) por parcela avaliada após 28 dias em temperatura de 15°C. Letras diferentes indicam que há diferença significativa segundo o teste de Tukey a 5%140
- Figura 5.1 - Distribuição de frequência (%) para: A) Pubescência do Limbo (1-Ausente, 2-Escassa, 3-Média, 4-Forte); B) Ângulo de inserção da folha bandeira (1-Ereto, 2-Intermediário, 3-Horizontal, 4-Descendente); C) Tipo da Panícula (1-Compacta, 2-Intermediária, 3-Aberta); D) Ramificações secundárias (1-Ausente e esparsas, 2-Densas, 3-Agrupadas); E) Posição das ramificações (1-Semi-ereto, 2-Intermediário, 3-Horizontal); F) Posição do eixo (1-Semi-vertical, 2-Ligeiramente curvado, 3-Curvado); G) Presença e comprimento da arista (1-Ausente, 2-Curta e parcialmente aristada, 3-Curta e completamente aristada, 4-Longa e parcialmente aristada, 5-Longa e completamente aristada); H) Cor da arista (1-Ausente 2-Palha, 3-Dourado, 4-Marrom, 5-Vermelho, 6-Púrpura, 7-Preto); I) Cor do apículo (1-Branca/amarela, 2-Marrom, 3-Vermelha, 4-Púrpura, 5-Preta).....160
- Figura 5.2 - Distribuição dos índices de diversidade de Shannon Weaver e Nei para nove variáveis categóricas na coleção inteira e na coleção nuclear de acessos japoneses de arroz161
- Figura 5.3 - Distribuição de frequência (%) comparativa entre as coleções inteira e nuclear para: A) Dias para o florescimento (classes: 1: 79-85; 2: 85-91; 3: 91-97; 4: 97-103; 5: 103-109; 6: 109-115; 7: 115-121; 8: 121-127; 9: 127-133; B) Dias para a maturidade (1: 109-114; 2: 114-120; 3: 120-125; 4: 125-131; 5: 131-136; 6: 136-142; 7: 142-147; 8: 147-153; 9: 153-158); C) Comprimento do colmo (1: 48-57; 2: 57-65; 3: 65-73; 4: 73-81; 5: 81-89; 6: 89-97; 7: 97-106; 8: 106-114; 9: 114-122); D) Altura de planta (1: 66-75; 2: 75-83; 3: 83-92; 4: 92-100; 5: 100-109; 6: 109-117; 7: 117-126; 8: 126-134; 9: 134-143); E) Comprimento da folha bandeira (1: 16-19; 2: 19-21; 3: 21-24; 4: 24-27; 5: 27-29; 6: 29-32; 7: 32-35; 8: 35-37; 9: 37-40); F) Largura da folha bandeira (1: 1,17-1,31; 2: 1,31-1,45; 3: 1,45-1,59; 4: 1,59-1,72; 5: 1,72-1,86; 6: 1,86-2,00; 7: 2,00-2,14; 8: 2,14-2,28; 9: 2,28-2,41);

G) Comprimento da panícula (1: 16,5-17,7; 2: 17,7-18,9; 3: 18,9-20; 4: 20-21,2; 5: 21,2-22,4; 6: 22,4-23,5; 7: 23,5-24,7; 8: 24,7-25,8; 9: 25,8-27); H) Produtividade de grãos (1: 0,12-0,25; 2: 0,25-0,37; 3: 0,37-0,5; 4: 0,5-0,63; 5: 0,63-0,75; 6: 0,75-0,88; 7: 0,88-1,00; 8: 1,00-1,13; 9: 1,13-1,25) 162

Figura 5.4 - Distribuição de frequência (%) comparativa entre a coleção inteira e a coleção nuclear para: A) Comprimento do grão (classes: 1: 6,71-7,07; 2: 7,07-7,42; 3: 7,42-7,78; 4: 7,78-8,13; 5: 8,13-8,49; 6: 8,49-8,84; 7: 8,84-9,2; 8: 9,2-9,56; 9: 9,56-9,91); B) Largura do grão (1: 2,5-2,65; 2: 2,65-2,81; 3: 2,81-2,96; 4: 2,96-3,12; 5: 3,12-3,27; 6: 3,27-3,43; 7: 3,43-3,58; 8: 3,58-3,74; 9: 3,74-3,89); C) Relação comprimento e largura do grão (1: 1,88-2,1; 2: 2,1-2,32; 3: 2,32-2,54; 4: 2,54-2,76; 5: 2,76-2,98; 6: 2,98-3,2; 7: 3,2-3,43; 8: 3,43-3,65; 9: 3,65-3,87); D) Massa de cem sementes (1: 1,99-2,19; 2: 2,19-2,39; 3: 2,39-2,59; 4: 2,59-2,79; 5: 2,79-2,99; 6: 2,99-3,2; 7: 3,2-3,4; 8: 3,4-3,6; 9: 3,6-3,8) 163

Figura 5.5 - Distribuição de frequência dos 181 alelos detectados por 24 marcadores SSRs na coleção inteira e na coleção nuclear de acessos japoneses 165

Figura 5.6 - Distribuição dos índices de diversidade de Shannon Weaver e Nei para 24 marcadores SSRs na coleção inteira e na coleção nuclear de acessos japoneses. Os doze primeiros marcadores são marcadores SSRs genômicos e os demais são EST-SSRs. Os marcadores estão organizados conforme sua posição no genoma..... 166

Figura 5.7 - Relação e distribuição espacial dos acessos da coleção inteira e da coleção nuclear para as características fenotípicas de variáveis categóricas (A) e contínuas (B) e marcadores moleculares microssatélites (C) 167

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Lista de descritores avaliados como variáveis categóricas em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras de sequeiro no ano agrícola 2007/2008 Piracicaba, SP	37
Tabela 2.2 - Lista de descritores avaliados como variáveis contínuas em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras de sequeiro no ano agrícola 2007/2008 Piracicaba, SP	38
Tabela 2.3 - Distribuição de frequência de dez características avaliadas como variáveis categóricas em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras	44
Tabela 2.4 - Resumo da análise de variância, média e valores extremos para as 13 características avaliadas como variáveis contínuas no ano agrícola 2007/2008 em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas	49
Tabela 2.5 - Variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genética (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genética (CVg) e CVg/CVe para 13 características avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2007/2008	51
Tabela 2.6 - Análise de variáveis canônicas para 13 características avaliadas como variáveis contínuas em 192 acessos de arroz e seis testemunhas	52
Tabela 2.7 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando as distâncias de Jaccard geradas por dez variáveis categóricas avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2007/2008	55
Tabela 2.8 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando as distâncias de Mahalanobis geradas por 13 variáveis contínuas avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2007/2008	56
Tabela 2.9 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando simultaneamente 13 variáveis contínuas e dez categóricas avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2007/2008	57
Tabela 2.10 - Resumo da análise de variância, média e valores extremos para as oito características avaliadas no ano agrícola 2008/2009 em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas	59
Tabela 2.11 - Variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genética (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genética (CVg) e CVg/CVe para oito características avaliadas em 192	

acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2008/2009	60
Tabela 2.12 - Resumo da análise de variância conjunta para oito características contínuas avaliadas nos anos agrícolas 2007/2008 e 2008/2009 em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz.....	61
Tabela 2.13 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando simultaneamente variáveis categóricas e contínuas avaliadas em dois anos agrícolas	62
Tabela 2.14 - Correlação entre as matrizes de dissimilaridade de 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz obtidas para variáveis categóricas (ano agrícola 2007/2008) e contínuas (anos agrícolas 2007/2008 e 2008/2009) e por soma de matrizes.....	63
Tabela 3.1 - Marcadores SSRs genômicos utilizados na identificação da diversidade genética em 192 acessos japoneses de arroz e 11 genótipos utilizados como padrões na análise de diversidade	79
Tabela 3.2 - Marcadores EST-SSRs utilizados na identificação da diversidade genética em 192 acessos japoneses de arroz e 11 genótipos utilizados como padrões na análise de diversidade.....	80
Tabela 3.3 - Estatísticas de diversidade genética para 24 marcadores SSRs utilizados na análise dos 203 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e 11 variedades internacionais (padrões)).....	86
Tabela 3.4 - Alelos exclusivos detectados entre os 192 acessos japoneses de arroz.....	87
Tabela 3.5 – Estimativas de diversidade para cada grupo identificado na análise de estrutura populacional de 192 acessos japoneses e 11 variedades de arroz	98
Tabela 3.6 - Distância genética de Nei (1983) baseada em 24 marcadores SSRs entre os grupos identificados pelo programa Structure.....	98
Tabela 4.1 - Resumo da análise de variância para comprimentos do coleóptilo e da radícula de sementes germinadas sob temperatura ótima (CC28 e CR28) e sob estresse por frio (CC13 e CR13), e para redução nos comprimentos do coleóptilo (RC) e da radícula (RR) devido ao frio avaliadas em 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio	123
Tabela 4.2 - Variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genotípica (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genético (CV_g) e CV_g/CV_e para comprimentos de coleóptilo e radícula avaliados em temperatura ótima e sob estresse por frio e redução nos comprimentos devido ao frio avaliados em 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio na germinação	127
Tabela 4.3 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as seguintes características: redução no comprimento do coleóptilo (RC), redução	

no comprimento da radícula (RR), comprimento do coleóptilo sob estresse por frio (CC13), comprimento da radícula sob estresse por frio (CR13), comprimento do coleóptilo em temperatura ótima (CC28) e comprimento da radícula em temperatura ótima (CR28) avaliadas em 195 genótipos de arroz.....	128
Tabela 4.4 - Componentes principais de quatro características usadas para avaliar a tolerância ao frio em 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio	128
Tabela 4.5 - Resumo da análise de variância para Índice de velocidade de germinação (IVG), Comprimento do coleóptilo (CC) e Comprimento da radícula (CR) avaliados em 17 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio em cinco temperaturas diferentes (11°, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C)	130
Tabela 4.6 - Resumo da análise de variância para genótipos dentro de temperatura para as características índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do coleóptilo (CC) e comprimento da radícula (CR) avaliados em dezessete acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio	131
Tabela 4.7 – Resumo da análise de variância para os efeitos da temperatura no desempenho de cada um dos vinte genótipos de arroz para as características índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do coleóptilo (CC) e comprimento da radícula (CR)	132
Tabela 4.8 – Comparação de médias do índice de velocidade de germinação de 20 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio) dentro de cada temperatura e de temperaturas dentro de cada genótipo.....	133
Tabela 4.9 – Comparação de médias do comprimento do coleóptilo (cm) de 20 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio) dentro de cada temperatura e de temperaturas dentro de cada genótipo.....	134
Tabela 4.10 - Comparação de médias do CR (cm) de 20 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio) dentro de cada temperatura e de temperaturas dentro de cada genótipo.....	135
Tabela 4.11 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as características Índice de velocidade de germinação (IVG), Comprimento do coleóptilo (CC) e Comprimento da radícula (CR) avaliadas nas temperaturas de 11°C, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C em 17 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio.....	136
Tabela 4.12 - Coeficientes da regressão linear do índice de velocidade de germinação e temperatura base para a germinação de dezessete acessos japoneses de arroz e de três testemunhas tolerantes ao frio.	137

Tabela 4.13 - Resumo da análise de variância para índice de Emergência (IE), Altura da plântula (AP), Comprimento da raiz (CR) e produção de matéria seca (MS) avaliadas em 17 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio.....	138
Tabela 5.1 - Coleção nuclear contendo 52 acessos japoneses do Banco de Germoplasma de arroz do Departamento de Genética da ESALQ/USP obtida com a estratégia PowerCore a partir da coleção de 192 acessos.....	158
Tabela 5.2 - Comparação da amplitude, média e variância entre a coleção original e a coleção nuclear para 13 variáveis contínuas.....	164

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o principal alimento para mais da metade da população mundial, e com produção de 684,7 milhões de toneladas ocupa posição de destaque entre os cereais cultivados, sendo superado em produção pelo trigo e pelo milho. O Brasil, com produção de 12,6 milhões de toneladas é o nono produtor mundial de arroz e é o maior produtor fora do continente asiático (FAO, 2011).

A espécie é de origem tropical, mas é cultivada em áreas que se estendem desde a latitude 50°N até 40°S e desde o nível do mar até altitudes próximas a 3000m. Essa ampla faixa de cultivo abrange predominantemente áreas tropicais, mas áreas temperadas e subtropicais também são cultivadas, podendo ocorrer temperaturas não favoráveis ao desenvolvimento das plantas em um ou mais estádios da cultura (YOSHIDA, 1981).

O rápido aumento da população mundial está gerando uma crescente demanda pelo aumento da produção de arroz (FAN, 2011). A produção do arroz duplicou entre 1966 e 1990, principalmente devido ao lançamento comercial de cultivares altamente produtivas advindas da Revolução Verde (KHUSH, 2005). Contudo, o uso intensivo do germoplasma melhorado de arroz, com genitores altamente aparentados entre si nos programas de melhoramento, reduziu a variabilidade genética disponível para se realizar a seleção, e o aumento na produtividade tem diminuído de 2,4% após a revolução verde no fim dos anos 80 para 0,9% por ano (HOSSAIN, 2007).

Contra a excessiva erosão da base genética das culturas, que é a principal causa apontada para a estagnação dos patamares de produtividade alcançada pelas cultivares modernas de arroz, é essencial a conservação de acessos em bancos de germoplasma. Os bancos de germoplasma têm sido estabelecidos como uma fonte de genes para incremento da produtividade agrícola, preservando a diversidade genética em espécies cultivadas, especialmente a presente em populações remanescentes de ancestrais selvagens (TANKSLEY; McCOUCH, 1997). O uso dos recursos genéticos avaliados nos bancos de germoplasma é uma importante estratégia para incorporação de variabilidade genética nos programas de melhoramento de arroz, os quais podem potencialmente gerar novas cultivares com

aumento da base genética e permitir novas e proveitosas combinações alélicas (McCOUCH, 2005).

A utilização efetiva de recursos genéticos armazenados em bancos de germoplasma, tanto para ampliação da base genética como para introdução de características de interesse, é dependente da sua caracterização e avaliação, envolvendo a descrição e registro de características agromorfológicas e moleculares, que são importantes para determinar a variabilidade genética que existe no conjunto de acessos e para auxiliar os melhoristas na escolha dos genótipos como genitores dos programas de pré-melhoramento e melhoramento. Estudos de diversidade genética em coleções envolvendo acessos originários do mundo todo (GARRIS et al., 2005; ALI et al., 2011; LI et al., 2010) e entre variedades tradicionais em escala local (THOMSON et al., 2007; EBANA et al., 2008; BORBA et al., 2009; THOMSON et al., 2009) têm sido realizados em arroz.

Os primeiros marcadores utilizados em plantas foram os marcadores morfológicos ou fenotípicos, baseados na comparação de características morfológicas entre os indivíduos, e podem prover uma representação razoável da diversidade e performance genética se as observações são baseadas em um número suficientemente grande de amostras e se as características mensuradas apresentam diferenças significativas entre indivíduos ou entre populações (HUMPHREYS, 1991). Os descritores para arroz são baseados principalmente em diferenças varietais quanto as características agromorfológicas referentes a arquitetura de planta, ciclo e de semente, tanto para variáveis contínuas como categóricas (IRRI, 1980; BIOVERSITY; IRRI; WARDA, 2007). No manuseio simultâneo de vários descritores agromorfológicos são empregadas técnicas de análise multivariada para prever a divergência genética, que é geralmente quantificada por medidas de dissimilaridade. Vários métodos multivariados podem ser aplicados após a obtenção das medidas de dissimilaridade entre os acessos, citando-se os métodos aglomerativos e a análise por componentes principais ou variáveis canônicas, que permitem o reconhecimento de grupos homogêneos e dos caracteres mais importantes para a avaliação da divergência genética (CRUZ; CARNEIRO, 2003). Métodos de classificação hierárquica, não hierárquica e estatística multivariada tentam aproximar ao máximo da verdadeira forma e estrutura dos grupos (CROSSA; FRANCO, 2004) e têm sido usadas no estudo da diversidade

genética em muitas espécies, inclusive em arroz (SANNI et al., 2008; SINGH et al., 2008; ALI et al., 2011).

Embora a caracterização morfológica seja usada rotineiramente em bancos de germoplasma, essa estratégia é sensível a influências do ambiente e nem sempre os caracteres são distinguíveis entre os acessos, principalmente quando a base genética é estreita (GILBERT et al., 1999). Várias técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de sequência de DNA. A informação molecular de diversidade e distância pode auxiliar no direcionamento do enriquecimento da base genética durante o andamento de um programa de melhoramento, bem como na avaliação da redundância e deficiências das coleções de germoplasma, gerando dados sobre a eficiência do processo de coleta, manutenção, manejo e ampliação de um banco de germoplasma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores microssatélites têm sido utilizados com sucesso na avaliação da diversidade genética em bancos de germoplasma e são considerados ideais à caracterização molecular de recursos genéticos por serem marcadores codominantes, abundantes, multialélicos e altamente polimórficos (VARSHNEY et al., 2005). Em arroz, um número considerável de marcadores microssatélites foram desenvolvidos e publicados (AKAGI et al., 1996; PANAUD et al., 1996; CHEN et al., 1997; TEMNYKH et al., 2000), existindo mais de 2.000 marcadores microssatélites desenvolvidos para a cultura (McCOUCH et al., 2002). Esses marcadores têm sido extensivamente utilizados em estudos de diversidade genética e estrutura de populações de muitas espécies, incluindo o arroz (NI et al., 2002, GARRIS et al., 2005; THOMSON et al., 2007; JIN et al., 2010). Comparando a informação genética oriunda de diversos tipos de marcadores, os marcadores microssatélites detectam um grau significativamente alto de polimorfismo em arroz (NI et al., 2002), indicando maior eficiência para diferenciar acessos de germoplasma, particularmente quando estes são aparentados (XU et al., 2004).

Além da descrição de acessos de germoplasma com a utilização de descritores agromorfológicos e marcadores moleculares, a busca por genes de interesse que contribuem para características de interesse agrônomo também é importante para a efetiva utilização de recursos genéticos em programas de melhoramento. A tolerância ao frio é uma destas características e é muito importante

em regiões onde a ocorrência de baixas temperaturas é comum durante o cultivo do arroz. Variação genética para tolerância ao frio em estádios iniciais de desenvolvimento da cultura tem sido reportada em algumas cultivares, particularmente entre a subespécie Japônica (STHAPIT; WITCOMBRE, 1998), e também há relatos mostrando que a germinação em condições de baixas temperaturas de cultivares provenientes de áreas de altas latitudes foi mais rápida do que a germinação de cultivares provenientes de cultivares de baixas latitudes (TAKAHASHI, 1997), sendo observado que cultivares nativas do Japão e da Coreia do Sul apresentaram alta germinação em baixas temperaturas.

O Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP recebeu germoplasma de outras instituições de pesquisa do Brasil e do exterior, incluindo acessos que pertenciam ao Instituto de Arroz de Sequeiro do Japão, atualmente extinto (informação pessoal, Dr. Akihiko Ando).

O arroz tem sido cultivado no Japão por cerca de 3000 anos, e embora tanto variedades da subespécie Japônica quanto Indica tenham sido cultivadas no passado, atualmente apenas o tipo Japônica é cultivado (NAKAGAHARA et al., 1997). A diversidade genética de variedades tradicionais japonesas parece ser menor do que a encontrada na coleção mundial de germoplasma mantida no *National Institute of Agrobiological Science* (NIAS) (KOJIMA et al., 2005), entretanto, há a expectativa de que cultivares de algumas regiões do Japão tenham diferentes polimorfismos para a adaptação a diferentes condições ambientais (EBANA et al., 2008).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos estudar a diversidade genética dos acessos japoneses pertencentes ao banco de germoplasma de arroz do Departamento de Genética da ESALQ/USP utilizando caracteres agromorfológicos e marcadores moleculares microssatélites, e identificar a variabilidade para tolerância ao frio na germinação.

Referências

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, p. 1071-1077, 1996.

ALI, M.L.; MCCLUNG, A.M.; JIA, M.H.; KIMBALL, J.A.; MCCOUCH, S.R.; EIZENGA, G.C. A rice diversity panel evaluated for genetic and agro-morphological diversity

between subpopulations and its geographic distribution. **Crop Science**, Madison, v. 51, p. 2021-2035, 2011.

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

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

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; MCCOUCH, S.R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 4, p. 553-567, 1997.

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

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

FAO. **FAOSTAT**: food and Agricultural commodities production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 24 nov. 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998. 220 p.

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

GILBERT, J.E.; LEWIS, R.V.; WILKINSON, M.J.; CALIGARI, P.D.S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 1125-1131, 1999.

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

HUMPHREYS, M.O. A genetic approach to the multivariate differentiation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars. **Heredity**, London, v. 66, p. 437-443, 1991.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Descriptors for rice (*Oryza sativa* L.)**. Manila, 1980. 21 p.

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

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

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

KOJIMA, Y.; EBANA, K.; FUKUOKA, S.; NAGAMINE, T.; KAWASE, M. Development of a RFLP-based rice diversity research set of germplasm. **Breeding Science**, Tokyo, v. 55, p. 431-440, 2005.

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

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

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

NAKAGAHARA, M.; OKUNO, K.; VAUGHAN, D. Rice genetic resources: history, conservation, investigative characterization and use in Japan. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 69-77, 1997.

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

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

SANNI, K.A.; FAWOLE, I.; GUEI, R.G.; OJO, D.K.; SOMADO, E.A.; TIA, D.T.; OGUNBAYO, S.A.; SANCHEZ, I. Geographical patterns of phenotypic diversity in *Oryza sativa* landraces of Côte d'Ivoire. **Euphytica**, Wageningen, v. 160, p. 389-400, 2008.

SINGH, S.; PRADHAN, S.K.; VIRK, P. Genetic divergence in new plant type rice under shallow lowland ecosystem. **SABRAO Journal of Breeding and Genetics**, Manila, v. 40, p. 1-8, 2008.

TAKAHASHI, N. Inheritance of seed germination and dormancy. In: MATSUO, T.; FUSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. **The science of the rice plant**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v. 3: Genetics: chap. 3, p. 348-359.

TANKSLEY, S.D.; MCCOUCH, S.R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**, Washington, v. 277, n. 5329, p. 1063-1066, 1997.

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

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

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

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

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

YOSHIDA, S. Climatic environment and its influence. In: _____. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: The International Rice Research Institute, 1981. chap. 2, p. 65-110.

2 DIVERSIDADE FENOTÍPICA EM GERMOPLASMA DE ARROZ JAPONÊS

Resumo

Há a necessidade de aumentar a base genética de variedades melhoradas para atender a demanda de aumento da produção de alimentos, e o primeiro passo nessa direção é a caracterização de variedades tradicionais armazenadas em bancos de germoplasma com base em caracteres agromorfológicos. Neste trabalho foi realizada a caracterização fenotípica de 192 acessos japoneses pertencentes ao banco de germoplasma de arroz do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Dez variáveis categóricas e treze contínuas foram avaliadas no primeiro ano agrícola e as variáveis contínuas que apresentaram maior contribuição para a variabilidade entre os acessos no primeiro ano agrícola (número de dias para o florescimento, comprimento do colmo, altura da planta, comprimento da panícula, comprimento da folha bandeira, largura da folha bandeira e número de dias para a maturidade) e produtividade de grãos foram avaliadas no segundo experimento para considerar os efeitos da interação genótipo por ambiente na diversidade fenotípica. Os acessos apresentaram variabilidade para as variáveis contínuas e categóricas, detectada em análises univariada e multivariada. Os dois tipos de variáveis utilizadas na avaliação e a interação genótipo por ano implicaram em diferentes padrões de agrupamento entre os acessos, sendo que o agrupamento mais consistente foi o realizado considerando todas as variáveis e os dois anos agrícolas, no qual os acessos foram divididos em 21 grupos pelo algoritmo de otimização de Tocher.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; Germoplasma; Descritores agromorfológicos; Análise multivariada

Abstract

In order to attend the demand for increasing food production, it is necessary to enlarge the genetic base of improved varieties and the first step towards this direction is to characterize accessions maintained in germplasm banks using agromorphological descriptors. Agromorphologic characterization of 192 Japanese rice accessions maintained at the Rice Germplasm Bank of Genetics Department at ESALQ/USP was done using 23 descriptors (13 continuous and ten categorical variables). The continuous variables that most contributed to the variability among accessions (days to flowering, culm length, plant height, panicle length, flag leaf length and width and days to maturity) as well as grain yield were evaluated in a second year experiment to take into account interaction effects on phenotypic diversity. Accessions presented variability for continuous and categorical variables, detected in uni and multivariate analyses. Both type of variable and the genotype by year interaction resulted in a different pattern of clustering of accessions. The

clustering accounting for all variables evaluated and the two harvest years was the most consistent, and accessions were divided into 21 clusters by Tocher's algorithm.

Keywords: *Oryza sativa*; Germplasm; Agromorphological descriptors; Multivariate analysis

2.1 Introdução

O arroz cultivado (*Oryza sativa* L.) mantém uma posição exclusiva entre as espécies cultivadas por ser consumido quase que exclusivamente por seres humanos e por ser o principal alimento para mais da metade da população mundial (IRRI, 2011). O aumento na demanda por produção de alimentos desencadeada pelo aumento da população mundial e o decréscimo na base de recursos naturais levam a necessidade de aumentar os atuais níveis de produtividade das principais culturas alimentícias, incluindo o arroz (FAN, 2011). Entretanto, o aumento na produtividade de arroz tem diminuído de 2,4% após a revolução verde no fim dos anos 80 para 0,9% por ano (HOSSAIN, 2007). O êxito do melhoramento de plantas é baseado na disponibilidade de variabilidade genética, conhecimento sobre as características desejadas pelo mercado consumidor e produtores, e eficientes estratégias de seleção que permitem a exploração e utilização de recursos genéticos. Esses recursos, felizmente estocados em bancos de germoplasma em várias partes do mundo, abrigam uma ampla gama de alelos necessários para resistência e tolerância a fatores de estresse biótico e abiótico encontrados em seus *habitats* naturais (HOISINGTON et al., 1999).

Devido à utilização de tecnologias advindas da revolução verde, e principalmente ao lançamento comercial de cultivares altamente produtivas, a produção mundial de arroz aumentou em 130%, passando de 257 milhões de toneladas em 1966 para 600 milhões de toneladas em 2000 (KHUSH, 2005). Contudo, o uso intensivo do germoplasma melhorado de arroz, com genitores altamente aparentados entre si nos programas de melhoramento, reduziu a variabilidade genética disponível para se realizar a seleção e tem levado à estagnação nos níveis de produtividade.

Há a necessidade de diversificar a base genética de variedades melhoradas, e o primeiro passo nessa direção é caracterizar os genótipos de variedades tradicionais tanto agrônomicamente quanto morfológicamente. Isso porque a avaliação da

diversidade fenotípica geralmente revela importantes características de interesse para os melhoristas (SINGH, 1989). Os descritores para arroz são baseados principalmente em diferenças varietais quanto a características agromorfológicas (IRRI, 1980; BIOVERSITY; IRRI; WARDA, 2007) e, tanto variáveis contínuas quanto categóricas têm sido tradicionalmente usadas para identificação de cultivares, estudos de variabilidade em bancos de germoplasma e identificação de genótipos com potencial para serem incorporados em programas de melhoramento.

Estudos de diversidade em arroz usando caracteres agromorfológicos foram relatados em variedades nativas e cultivadas em Yunnan, China (ZENG et al., 2003), em germoplasma de arroz de terras altas em Jeypore tract of Orissa, Índia (PATRA et al., 2003), que é um dos centros secundários de origem do arroz, entre variedades crioulas no Nepal (BAJRACHARYA et al., 2006) e do Paquistão (ZAFAR et al., 2004), cultivares chinesas (QI et al., 2006), cultivares aromáticas da Ásia (HIEN et al., 2007), e da coleção nuclear de arroz da EMBRAPA (BRONDANI et al., 2008).

Durante o processo de domesticação, a espécie *Oryza sativa* tornou-se altamente diversificada de modo que atualmente existem diferentes cultivares adaptadas a uma ampla gama de condições, incluindo diferentes sistemas de cultivo como irrigado e de sequeiro, condições de solo, topografia, fotoperíodo e temperatura (TAKAHASHI, 1984; IRRI, 1984), podendo ser encontrada em cultivos na Ásia, África, Oceania, e América do Sul, Central e do Norte. Um grande número de variedades tradicionais, desenvolvidas nos primórdios da agricultura na Ásia e na África são produtos tanto de seleção natural como seleção feita pelo homem (HOYT, 1988) e elas são geralmente bastante heterogêneas, tendo uma grande variabilidade tanto dentro como entre populações (OKA, 1988).

O Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz, e o maior produtor fora do continente asiático (FAO, 2011). Embora cerca de 75% da produção brasileira de arroz venha do sistema irrigado devido à maior produtividade e tecnologia empregada nesse sistema, o cultivo de sequeiro ocupa 50% da área cultivada com arroz (CLEYTON; NEVES, 2011). Estudos do ganho genético para a produtividade de grãos nos programas de melhoramento de arroz de sequeiro no Brasil demonstraram redução nos ganhos, e indicam que novas alternativas de melhoramento devem ser empreendidas (BRESEGHELLO et al., 2006; SOUZA et

al., 2007). Recentemente, uma nova classe de cultivares adaptadas ao sistema de sequeiro com resistência ao acamamento e melhores índices de colheita do que as variedades tradicionais tem sido desenvolvida por programas de melhoramento na China, nas Filipinas (ATLIN et al., 2006) e no Brasil (PINHEIRO et al., 2005). A utilização dos recursos genéticos disponíveis em bancos de germoplasma é uma estratégia importante para incorporação de variabilidade em programas de melhoramento, o que pode potencialmente gerar novas cultivares com o aumento da base genética e obtenção de novas combinações alélicas (McCOUCH, 2005).

Anteriormente ao advento de ferramentas moleculares, a diversidade genética era estimada com base na genealogia ou características agrônomicas e morfológicas. Estimativas baseadas no parentesco podem ser sub ou superdimensionadas devido a suposições irreais como a ausência de seleção no cálculo da similaridade (ALMANZA-PINZON et al., 2003; FUFA et al., 2005), enquanto observações fenotípicas fornecem uma representação razoável da performance genética se elas forem baseadas em um número de amostras suficientemente grande e se as características avaliadas apresentam diferenças significantes entre populações ou grupos (HUMPHREYS, 1991). Li et al. (2010) relataram em estudo da mini-coleção nuclear de arroz do USDA que a diferenciação genética identificada por marcadores moleculares foi alta e significativamente correlacionada com a diferenciação por características fenotípicas.

A variação fenotípica pode ser estudada usando vários métodos, incluindo técnicas de análises multivariadas, nas quais, diferentemente de análises univariadas, todas as variáveis independentes (características avaliadas) são consideradas simultaneamente na diferenciação de cultivares ou populações. Esse tipo de abordagem resulta em maior diferenciação de populações ou grupos em comparação com a análise univariada.

Na conservação de recursos genéticos e no melhoramento de plantas são coletados dados de variáveis contínuas e de variáveis categóricas ou qualitativas. Genótipos de indivíduos podem ser conceituados como sendo localizados em um espaço multidimensional no qual há uma dimensão para cada característica. A forma e estrutura dos grupos de genótipos nesse espaço multidimensional são desconhecidas, mas a associação (correlação) entre as características influencia a forma dos grupos, e a estrutura é afetada pela verdadeira composição dos grupos.

Métodos de classificação hierárquica, não hierárquica e estatística tentam aproximar ao máximo a verdadeira forma e estrutura dos grupos (CROSSA; FRANCO, 2004). Análises multivariadas baseadas em características agronômicas e morfológicas têm sido usadas no estudo da diversidade genética em muitas espécies, inclusive em arroz (SANNI et al., 2008; SINGH et al., 2008; ALI et al., 2011).

O efetivo uso de recursos genéticos com o objetivo de solucionar problemas de produção pode ser desafiador devido ao inadequado conhecimento de como diferentes características e diferentes fatores ambientais interagem afetando o desempenho dos genótipos (COOPER; BYTH, 1996). De fato, a maioria das características de interesse agrônomo é de herança complexa, sendo estas afetadas pelo ambiente, e esta interação genótipo por ambiente afeta o comportamento de acessos quando avaliados em diferentes ambientes (HOPKINS et al., 1995; BRONDANI et al., 2006; RODRIGUEZ et al., 2008) e conseqüentemente a estruturação dos grupos identificados na sua caracterização (HOOPERHEIDE, 2009).

O Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP possui germoplasma proveniente de outras instituições de pesquisa do Brasil e do exterior. Entre os acessos presentes tem-se aqueles recebidos do Instituto de Arroz de Sequeiro do Japão que foi extinto (informação pessoal, Dr. Akihiko Ando). Neste trabalho buscou-se caracterizar os acessos japoneses nas condições de cultivo de sequeiro no Brasil e estimar a diversidade genética entre os mesmos.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Instalação e condução dos experimentos

Os experimentos para caracterização e avaliação de 192 acessos japoneses de arroz do banco de germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ/USP (ANEXO A) foram conduzidos no campo experimental do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) localizado no

município de Piracicaba - SP, nos anos agrícolas 2007/2008 e 2008/2009. A densidade de semeadura foi de 60 sementes por metro linear e o espaçamento entre linhas de 40 cm. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos aumentados com seis testemunhas comuns representadas pelas cultivares de sequeiro Caiapó, Curinga, BRS Sertaneja, IAC 1246, IAC 201 e IAC 202. A parcela experimental consistiu de quatro fileiras de 2,0 m de comprimento, sendo a área útil da parcela composta pelas duas linhas centrais. Uma visão do experimento é apresentada na Figura 2.1.

Figura 2.1 - Visão do experimento conduzido no campo experimental do departamento de Genética da ESALQ/USP no ano agrícola 2007/2008 para caracterização agromorfológica de 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz

2.2.2 Caracterização e avaliação dos acessos

2.2.2.1 Descritores utilizados no ano agrícola 2007/2008

A caracterização e avaliação dos acessos foram feitas de acordo com alguns descritores indicados pelo IBPGR-IRRI *Rice Advisory Committee* (1980) e BIOVERSITY, IRRI e WARDA (2007). Foram utilizados 23 descritores, sendo que dez deles foram avaliados como variáveis categóricas (Tabela 2.1) e 13 foram avaliadas como variáveis contínuas (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 - Lista de descritores avaliados como variáveis categóricas em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras de sequeiro no ano agrícola 2007/2008 Piracicaba, SP

Característica	Descrição	Método e época de avaliação
Cor da aurícula	1. Verde claro 2. Púrpura	Avaliada próximo ao florescimento.
Pubescência do limbo (PL)	1. Ausente 2. Escassa 3. Média 4. Forte	Avaliada no emborrachamento.
Inserção da folha bandeira (IFB)	1. Ereto - menor que 30° 2. Intermediário - entre 31 e 60° 3. Horizontal - entre 61 e 90° 4. Descendente - maior que 90°	Ângulo formado pela folha bandeira e o colmo. Avaliado na época da floração.
Tipo de panícula	1. Compacta 2. Intermediária 3. Aberta	Determinada na maturação.
Posição das ramificações da panícula	1. Semi-ereto 2. Intermediário 3. Horizontal	Determinada próximo à maturação.
Posição do eixo principal da panícula	1. Semi-vertical 2. Ligeiramente curvado 3. Curvado	Determinada próximo à maturação.
Ramificação secundária (RS)	1. Ausentes e Esparsas 2. Densas 3. Agrupadas	Determinada próximo à maturação.
Presença e comprimento da arista (PCA)	1. Ausente 2. Curta e parcialmente aristada 3. Curta e completamente aristada 4. Longa e parcialmente aristada 5. Longa e completamente aristada	Determinada após o florescimento.
Cor do ápulo na floração (CAP)	1. Branca/Amarela 2. Marrom 3. Vermelha 4. Púrpura 5. Preta	Determinada após o florescimento.
Cor da arista na floração (CAR)	1. Ausente 2. Palha 3. Marrom 4. Vermelho 5. Púrpura 6. Preto	Determinada no florescimento.

Tabela 2.2 - Lista de descritores avaliados como variáveis contínuas em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras de sequeiro no ano agrícola 2007/2008 Piracicaba, SP

Característica	Método e época de avaliação
Número de dias para o florescimento (NDF)	Número de dias ocorridos da semeadura até quando 50% das panículas estão floridas.
Número de perfilhos (NP)	Obtido para 10 plantas, em contagem realizada após a floração.
Comprimento do colmo (CC)	Medida da superfície do solo até a base da panícula, a partir do enchimento de grãos em 10 plantas (cm).
Altura da planta na maturidade (APM)	Medida da superfície do solo até a extremidade da panícula do colmo mais alto, a partir do enchimento dos grãos. Avaliada em 10 plantas (cm).
Comprimento da Panícula (CP)	Distância da base da panícula à ponta da última espiguetta, determinada na época da colheita em 10 plantas (cm).
Comprimento da folha bandeira (CFB)	Medida do limbo, da lígula ao ápice da folha bandeira, à época da colheita. Avaliada em 10 plantas (cm).
Largura da folha bandeira (LFB)	Medida na região de maior largura do limbo da folha bandeira, à época da colheita. Avaliada em 10 plantas (cm).
Número de dias para a maturidade (NDM)	Compreende o período entre a germinação e a maturação completa, quando 85-90% dos grãos estão maduros.
Produtividade de grãos (PG)	Determinada pela pesagem dos grãos colhidos na parcela útil, após limpeza e secagem uniforme, com umidade corrigida para 13% (kg).
Massa de cem sementes (MCS)	Média de cinco amostras de 100 sementes por parcela com umidade de 13%. (g)
Comprimento do grão (CG)	Medido em 10 grãos, com paquímetro (mm).
Largura do grão (LG)	Medida em 10 grãos, com paquímetro (mm).
Relação CG e LG (CG/LG)	Obtida pela divisão entre o CG e a LG.

Para as variáveis categóricas foi obtida a moda de cada variável por acesso e para as variáveis contínuas foram usadas as médias de dez observações por parcela para a análise estatística, com exceção de NDF, NDM e PG que foram avaliadas em nível de parcela e MCS que foi obtida pela média de cinco amostras.

2.2.2.2 Descritores utilizados no ano agrícola 2008/2009

As características que apresentaram maior contribuição para a variabilidade entre os acessos no ano agrícola 2007/2008 foram avaliadas no ano agrícola 2008/2009.

As características NDF, CC, APM, CP, CFB, LFB e NDM apresentaram maior contribuição do que as outras características para a divergência entre os acessos e foram avaliadas no segundo ano agrícola para considerar a interação genótipo por ano no estudo da divergência genética. A produtividade de grãos também foi avaliada pela sua importância agrônômica.

2.2.3 Análise de dados

2.2.3.1 Estatísticas descritivas, análise univariada e estimativa de parâmetros

Estatísticas descritivas incluindo a distribuição de frequência para as variáveis contínuas e categóricas e a média, amplitude e desvio padrão para as variáveis contínuas foram calculadas para os acessos e para as testemunhas. Os dados obtidos para as variáveis contínuas para cada ano agrícola foram submetidos à análise de variância para o delineamento em blocos aumentados, seguindo o modelo matemático:

$$Y_{i'j} = \mu + t_i + t_{i'j} + b_j + e_{ij}$$

Em que

$Y_{i'j}$: é o valor observado na parcela do bloco j que recebeu o tratamento comum i ou tratamento adicional i';

μ : é o efeito fixo da média geral;

t_i : é o efeito fixo do tratamento comum i; com $i = 1, 2, \dots, T$;

$t_{i'j}$: é o efeito do tratamento adicional i' do bloco j, tido como aleatório; com $i' = 1, 2, \dots, n_j - T$; onde n_j = número de parcelas do bloco j;

b_j : é o efeito aleatório do bloco j; com $j = 1, 2, \dots, B$

e_{ij} é o efeito aleatório do erro experimental associado à parcela do bloco j que recebeu o tratamento comum i ou o tratamento adicional i' ; admite-se que o erro tem distribuição normal e é independentemente distribuído com média zero e variância σ^2 .

Os dados obtidos para as variáveis contínuas avaliadas nos dois anos agrícolas foram submetidos à análise de variância conjunta para o delineamento em blocos aumentados. Para a análise conjunta, os efeitos de ano e interação genótipo por ano foram adicionados no modelo matemático apresentado anteriormente.

Os seguintes parâmetros foram estimados para cada variável em cada ano agrícola: variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genética (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genética (CVg) e relação CVg/CVe.

2.2.3.2 Análises multivariadas

A divergência genética entre os acessos foi quantificada através de análises estatísticas multivariadas, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis para as variáveis contínuas e o complemento do coeficiente aritmético de Jaccard para as variáveis categóricas. O método de agrupamento utilizado foi o algoritmo de otimização de Tocher e a análise de variáveis canônicas foi feita para determinar os descritores de variáveis contínuas que mais contribuem para a variabilidade entre os acessos.

Matrizes de distância

Para as variáveis categóricas, foi obtida inicialmente a moda de cada variável por acesso e os valores convertidos em dados binários do tipo 0 e 1, atribuídos respectivamente pela ausência e presença da categoria no acesso. Posteriormente, foi calculado o complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, dado por:

$$d_{ii'} = 1 - s_{ii'}$$

Em que

$$S_{ii'} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que

a: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 1-1 para cada par de acessos;

b: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 1-0 para cada par de acessos;

c: valor que quantifica o número de coincidências do tipo 0-1 para cada par de acessos;

Para as variáveis contínuas, as médias ajustadas de cada acesso em relação aos caracteres estudados e a matriz de dispersão obtidas através do procedimento de análise de variância foram utilizadas para o cálculo da distância generalizada de Mahalanobis. As distâncias de Mahalanobis foram estimadas a partir de variáveis transformadas por condensação pivotal e padronizadas utilizando-se a seguinte expressão:

$$D_{ii'}^2 = \sum (z_{ij} - z_{i'j})^2$$

Em que

$D_{ii'}^2$: é a distância generalizada de Mahalanobis entre os genótipos i e i';

$z_{ij} - z_{i'j}$: é a diferença entre os genótipos i e i' em relação à j-ésima variável;

z_{ij} : é a variável transformada padronizada (não-correlacionada) ou seja, a média do i-ésimo genótipo em relação à j-ésima variável com variância igual a 1.

A partir das distâncias obtidas entre os pares de genótipos, foram construídas duas matrizes de dissimilaridade para o primeiro ano agrícola de avaliação, uma matriz para as variáveis categóricas (complemento aritmético de Jaccard) e outra para as variáveis contínuas (distância generalizada de Mahalanobis). Uma matriz total de distâncias foi obtida para analisar a divergência entre os acessos

considerando-se simultaneamente as variáveis categóricas e contínuas avaliadas no primeiro ano agrícola. Essa matriz foi obtida pela soma das matrizes obtidas pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e pela distância generalizada de Mahalanobis. Os valores de distância para cada matriz foram padronizados anteriormente ao cálculo da matriz total de distância. Isso foi necessário porque a amplitude dos valores de distância varia de zero a um na matriz de distâncias obtida pelo coeficiente aritmético de Jaccard e de zero a $+\infty$ na matriz obtida pela distância generalizada de Mahalanobis.

Para o segundo ano agrícola, obteve-se uma matriz de distância de Mahalanobis. Essa matriz foi somada com a matriz total de distância obtida para o primeiro ano, para considerar a interação genótipo por ano na detecção da divergência entre os acessos.

Análise de agrupamento

Os acessos foram agrupados pelo algoritmo de otimização de Tocher, sendo realizados agrupamentos considerando-se somente variáveis contínuas e somente variáveis categóricas no ano 2007/2008. Também foi feito o agrupamento com base na matriz resultante da soma das matrizes de dissimilaridade para o ano 2007/2008 e para a matriz soma obtida em 2007/2008 com a matriz de 2008/2009.

Para a definição dos agrupamentos utilizando o algoritmo de otimização de Tocher, na matriz de dissimilaridade é identificado o par de genótipos mais similares, que formam o grupo inicial. A partir daí, outros genótipos são incluídos no grupo adotando-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos. O acréscimo de um genótipo em um grupo sempre aumenta o valor médio da distância dentro do grupo. Assim, o genótipo é incluído em um grupo por meio da comparação entre o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e um nível máximo permitido, que será o valor máximo da medida de dissimilaridade, encontrado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada genótipo.

Análise de Variáveis Canônicas

A análise de variáveis canônicas foi utilizada para resumir a informação contida nas variáveis contínuas avaliadas no ano agrícola 2007/2008 e identificar as características que apresentam maior contribuição para a variabilidade entre os acessos. Técnicas de variáveis canônicas permitem a simplificação do conjunto de dados, resumindo as informações originalmente contidas em um grupo v de variáveis, em poucas variáveis que apresentam a propriedade de reter o máximo da variação originalmente disponível e de serem independentes entre si. A técnica de variáveis canônicas consiste em transformar o conjunto de n variáveis $x_{i1}, x_{i2} \dots x_{in}$ em um novo conjunto $Y_{i1}, Y_{i2} \dots Y_{in}$, em que as variáveis canônicas Y_i s são funções lineares das variáveis x_i s e independentes entre si, sendo que a primeira variável canônica é a de maior variância, seguida pela segunda de maior variância, e assim sucessivamente para as demais.

A análise por variáveis canônicas, combinada com os agrupamentos revelados por Tocher foi utilizada para permitir a visualização da divergência a partir da dispersão gráfica dos escores das duas primeiras variáveis canônicas em relação a dois eixos cartesianos.

As análises foram realizadas no programa GENES (CRUZ, 2001) e os gráficos foram construídos nos programas STATISTICA (STATSOFT INC., 2011) e R (HORNIK, 2011).

2.3 Resultados

2.3.1 Características avaliadas no ano agrícola 2007/2008

Distribuição de frequência das variáveis contínuas e categóricas

Grande variação foi observada para as características avaliadas como variáveis categóricas, com exceção de cor da aurícula para a qual todos os genótipos apresentaram aurícula verde claro. Acessos pertencentes a quase todas as classes em que cada descritor é dividido de acordo com a lista de descritores *Descriptors for wild and cultivated rice* (BIOVERSITY INTERNATIONAL; IRRI; WARDA, 2007) foram observados (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Distribuição de frequência de dez características avaliadas como variáveis categóricas em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras

Característica	Frequência (%)
Cor da aurícula	
Verde Claro	198 (100%)
Pubescência do limbo	
Ausente	37 (18,68%)
Escassa	31 (15,66%)
Média	101 (51,01%)
Forte	29 (14,65%)
Ângulo de inserção da folha bandeira	
Ereto	47 (23,74%)
Intermediário	135 (68,18%)
Horizontal	13 (6,57%)
Descendente	3 (1,52%)
Tipo de panícula	
Compacta	6 (3,03%)
Intermediária	86 (43,43%)
Aberta	106 (53,54%)
Posição do eixo principal da panícula	
Semi-vertical	14 (7,07%)
Ligeiramente curvado	153 (77,27%)
Curvado	31 (15,66%)
Posição das ramificações da panícula	
Semi-ereto	85 (42,93%)
Intermediário	103 (52,02%)
Horizontal	10 (5,05%)
Ramificações secundárias da panícula	
Ausentes e Esparsas	29 (14,65%)
Densas	108 (54,55%)
Agrupadas	61 (30,81%)
Presença e comprimento da arista	
Ausente	101 (51,01%)
Curta e parcialmente aristada	63 (31,81%)
Curta e completamente aristada	13 (6,57%)
Longa e parcialmente aristada	2 (1,01%)
Longa e completamente aristada	19 (9,60%)
Cor da arista	
Ausente	101 (51,01%)
Palha	61 (30,8%)
Marrom	3 (1,52%)
Vermelho	15 (7,58%)
Púrpura	17 (8,59%)
Preto	1 (0,51%)
Cor do ápulo	
Branca/Amarela	123 (62,12%)
Marrom	20 (10,1%)
Vermelha	15 (7,58%)
Púrpura	39 (19,7%)
Preta	1 (0,51%)

Pelo menos metade dos acessos pertenceu a uma mesma classe dentre as variáveis categóricas avaliadas, enquanto que os outros acessos foram distribuídos

entre as outras classes. Como exemplo a variação para cor de arista é apresentado na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Exemplo de diferenças observadas para arista em acessos japoneses de arroz

Para as variáveis contínuas, os acessos apresentaram grande variabilidade. A distribuição de frequência para estas características é apresentada na Figura 2.3.

A maior parte dos acessos (164 dos 192 acessos) apresentou baixa altura de planta, sendo classificados como semi-anãs (< 110 cm) juntamente com as testemunhas. Apenas dois acessos foram classificados como altos (> 130 cm), e os demais apresentaram altura intermediária.

Quanto ao ciclo, 13 acessos foram classificados como precoces, atingindo a maturidade entre 101 e 115 dias após a semeadura. As testemunhas foram intermediárias, juntamente com 140 acessos (116 a 130 dias), 33 acessos foram tardios (131-145) e seis muito tardios (> 145 dias até a maturidade).

Considerando-se as características de grão, a maior parte dos acessos (135) apresentou grãos intermediários (8 a 10 mm), juntamente com cinco testemunhas embora as testemunhas tenham apresentado comprimento maior do que 9 mm. Cinquenta e sete acessos apresentaram grãos curtos (< 8 mm), e somente a testemunha BRS Sertaneja apresentou grãos longos (> 10 mm). A maior parte dos acessos apresentou grãos largos, o que ocasiona baixos valores para relação comprimento e largura para a maioria deles.

(continua)

Figura 2.3 - Distribuição de frequência de 12 características avaliadas como variáveis contínuas no ano agrícola 2007/2008 em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas

Figura 2.3 – Distribuição de frequência de 12 características avaliadas como variáveis contínuas no ano agrícola 2007/2008 em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas

Estatísticas descritivas, análise de variância e estimativas de parâmetros genéticos das variáveis contínuas

Houve diferença significativa entre os acessos para 11 das 13 características avaliadas como variáveis contínuas, sendo encontrados acessos com valores contrastantes para essas características. O resultado do teste F e as estatísticas descritivas para as variáveis contínuas avaliadas nos acessos e nas testemunhas são sumarizadas na Tabela 2.4.

Os acessos japoneses quando comparados com as cultivares comerciais utilizadas como testemunhas no primeiro ano de avaliação agromorfológica apresentaram em média, maior precocidade, refletida em valores menores para NDF e NDM, maior estatura de planta, refletida em maior CC e APM, e grãos mais curtos e estreitos, refletidos pelo menor CG e maior LG.

Foram observados acessos com valores menores e acessos com valores maiores do que as testemunhas para as características avaliadas, com exceção das características relacionadas ao grão, em que a cultivar comercial BRS Sertaneja apresentou o maior comprimento do grão, a menor para largura do grão e consequentemente, a maior relação comprimento largura do grão entre todas as testemunhas e acessos avaliados. Exemplos de valores extremos observados para altura de planta e comprimento do grão são apresentados na Figura 2.4.

Tabela 2.4 - Resumo da análise de variância, média e valores extremos para as 13 características avaliadas como variáveis contínuas no ano agrícola 2007/2008 em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas

FV	GL	QM												
		NDF	CC	APM	CP	CFB	LFB	NDM	PG	NP	MCS	CG	LG	CG/LG
Blocos	5	169,846	374,74	453,078	7,154	19,373	0,0087	112,54	0,0749	4,312	0,119	0,9216	0,0927	0,1686
Genótipos (aj)	197	96,337**	122,6**	136,93**	3,599**	18,791**	0,0567**	72,21**	0,04 ^{ns}	0,75 ^{ns}	0,14**	0,561**	0,1696**	0,32**
Resíduo	25	7,17	22,479	28,822	1,560	4,379	0,0057	5,2	0,0286	0,494	0,010	0,041	0,0038	0,0055
CV (%)		2,833	6,192	5,52	6,034	7,158	4,37	1,813	24,495	12,956	3,467	2,396	1,885	2,847
Média geral		94,504	76,568	97,245	20,698	29,234	1,732	125,78	0,690	5,429	2,928	8,459	3,302	2,623
Média acesso		93,208	77,870	98,446	20,601	28,516	1,710	124,79	0,670	5,460	2,982	8,298	3,427	2,446
Máx (acesso)		132,58 (191J)	121,97 (250J)	142,91 (250J)	26,97 (199J)	40,07 (160J)	2,42 (45J)	158,03 (191J)	1,25 (219J)	7,95 (6J)	3,80 (106J)	9,91 (236J)	3,89 (130J)	3,87 (202J)
Mín (acesso)		79,58 (397J)	48,39 (276J)	66,02 (276J)	16,58 (409J)	16,04 (133J)	1,17 (113J)	109,03 (407J)	0,124 (245J)	3,45 (68J)	1,99 (374J)	6,71 (367J)	2,50 (175J)	1,88 (48J)
Média test		101,41	69,622	90,840	21,218	33,065	1,848	131,027	0,797	5,266	2,641	9,320	2,638	3,566
Máx (test)		105,17 (CAI)	80,48 (CAI)	101,32 (CAI)	23,35 (SERT)	37,53 (SERT)	1,97 (SERT)	133,83 (CAI)	0,894 (202)	6,02 (202)	3,24 (1246)	10,26 (SERT)	3,08 (1246)	4,17 (SERT)
Mín (test)		97 (SER)	62,26 (CUR)	81,37 (CUR)	19,1 (CUR)	25,65 (CUR)	1,59 (CUR)	127 (1246)	0,718 (CAI)	4,72 (CAI)	2,36 (201)	9,01 (CAI)	2,46 (SERT)	2,95 (1246)

** : significativo a 1% pelo teste F e ^{ns} : não significativo

Figura 2.4 - Exemplo de valores extremos observados entre 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz: a) altura de planta 70 dias após a semeadura e na maturidade ; b) característica de panícula e de grãos

Estimativas da variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genética (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genética (CVg) e relação CVg/CVe são apresentadas na Tabela 2.5. A estimativa do CVg foi maior para produtividade de grãos e menor para comprimento da panícula. A relação CVg/CVe mostrou que existe situação favorável à seleção (valores maior que 1) em 11 das 13 características avaliadas. A herdabilidade variou de 31,33% para produtividade de grãos e 33,64% para número de perfilhos a 95,11% para relação comprimento e largura do grão. As demais características apresentaram herdabilidade média a alta (0,6 a 0,94).

Tabela 2.5 - Variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genética (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genética (CVg) e CVg/CVe para 13 características avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2007/2008

Característica	σ_p^2	σ_e^2	σ_g^2	h^2	CVg (%)	CVg/CVe
Dias para o florescimento	87,61	7,17	80,44	91,81	9,62	3,35
Comprimento do colmo	123,31	22,47	100,82	81,76	12,89	2,12
Altura da planta na maturidade	144,85	28,86	115,99	80,07	10,94	2,00
Comprimento da panícula	3,93	1,56	2,37	60,32	7,47	1,23
Comprimento da folha bandeira	16,19	4,37	11,82	72,96	12,05	1,64
Largura da folha bandeira	0,053	0,0057	0,048	89,37	12,83	2,90
Dias para a maturidade	68,38	5,2	63,18	92,39	6,37	3,49
Produtividade de grãos	0,042	0,028	0,013	31,33	17,04	0,68
Número de perfilhos	0,74	0,49	0,25	33,64	9,17	0,71
Massa de cem sementes	0,11	0,010	0,10	90,95	10,79	3,17
Comprimento do grão	0,39	0,041	0,35	89,58	7,16	2,93
Largura do grão	0,068	0,004	0,064	94,32	7,41	4,07
Relação comprimento e largura do grão	0,11	0,006	0,108	95,11	13,46	4,41

Análise de variáveis canônicas

A análise de variáveis canônicas foi utilizada para resumir a informação contida nas 13 características avaliadas como variáveis contínuas. As quatro

primeiras variáveis canônicas responderam por 93,66% da variabilidade fenotípica total observada entre os acessos (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 - Análise de variáveis canônicas para 13 características avaliadas como variáveis contínuas em 192 acessos de arroz e seis testemunhas

Característica	Importância relativa das características			
	VC1	VC2	VC3	VC4
Dias para o florescimento	-7,303	0,427	-2,014	-0,747
Comprimento do colmo	-1,446	-2,405	-1,881	-1,316
Altura da planta na maturidade	-0,417	1,248	1,700	1,355
Comprimento da panícula	-1,485	-0,307	-0,674	0,158
Comprimento da folha bandeira	-1,033	-0,684	-0,260	1,087
Largura da folha bandeira	2,888	-0,357	0,480	-0,799
Dias para a maturidade	6,686	-2,014	2,030	0,906
Produtividade de grãos	1,650	-0,061	0,067	-0,596
Número de perfilhos	0,574	1,242	0,426	0,179
Massa de cem sementes	-1,150	-0,042	-0,370	0,689
Comprimento do grão	1,498	0,364	0,804	-0,114
Largura do grão	2,176	-0,255	-0,107	-0,065
Relação comprimento largura do grão	-0,533	0,130	0,321	-0,088
Autovalor	284,123	65,624	23,371	11,981
Variância total explicada na VC	69,100	15,960	5,684	2,914
Variância total acumulada	69,100	85,060	90,744	93,658

As características que apresentaram maior importância relativa nas primeiras variáveis canônicas foram características de ciclo (NDF e NDM), de porte de planta (CC e APM) e de folha (CFB e LFB). NDF variou de 80 (acesso 397J - Korotou Mochi) a 130 dias (acesso 191J - Col/Fuzui/1965), APM variou de 66,02 (276J - Arabiya Mochi) a 142,9 cm (250J - Jouon), CFB variou de 16,04 (133J - Nourin Mochi) a 40,07cm (160J - Gaisen Mochi) e LFB variou de 1,17 (113J - Kyuushuu) a 2,42 cm (45J - Mitsukasane). Cerca de 85% da variação total pode ser explicada pelas duas primeiras VCs que explicaram 69,1% e 15,96% respectivamente, o que torna possível a análise gráfica da distribuição dos acessos considerando-se o seu posicionamento conforme os escores das duas primeiras variáveis canônicas (Figura 2.5).

Figura 2.5 - Distribuição de 192 acessos japoneses de arroz e de seis cultivares brasileiras de arroz (testemunhas) identificada pelos escores dos genótipos para as duas primeiras variáveis canônicas

Considerando os escores das primeiras variáveis canônicas, os acessos 113J - Kyuushuu, 236J - Toga, 369J - Japão 7, 413J - Chousen e 14J - Yamanoi destacaram-se como os que apresentaram menores valores para a primeira variável canônica. Esses acessos se destacam por apresentar LFB e LG menores que a média geral dos acessos, enquanto os acessos 130J - Esojima, 45J - Mitsukasane e 48J - Mie, que apresentaram maiores valores de escores para a primeira variável canônica, apresentaram folha bandeira e grãos mais largos que a média dos acessos. Na segunda variável canônica, destacaram-se os acessos 122J - Chiyoda Wase, 286J - Nourin 7, 52J - Mizuhoshi, 409J - Mie e 407J - Edogawa por apresentarem maiores escores e os acessos 191J - Col/Fuzui/1965, 391J - Kurumi Wase 43, 269J - Nourin Mochi 6, 200J - Hitachi Nishiki e 245J - Ishiwari Mochi por

apresentarem os menores escores. Os acessos com maiores escores para essa variável são mais precoces do que aqueles com menores escores.

Análise de agrupamento

Variáveis categóricas

Considerando-se apenas as variáveis categóricas, os acessos foram distribuídos em 18 grupos de similaridade (Tabela 2.7), sendo que cinco acessos (250J - Jouon, 23J - Sonobe Mochi, 48J - Mie, 172J - Oohataho e 99J - Eika Ine) ficaram sozinhos em seu grupo (grupos XIV a XVIII). As testemunhas foram reunidas no mesmo grupo (grupo VII), juntamente com o acesso 134J - Suzume Shirazu.

Variáveis contínuas

O algoritmo de otimização de Tocher reuniu os acessos em 15 grupos considerando-se as variáveis contínuas (Tabela 2.8). A maioria dos acessos (153 dos 192) foi reunida em dois grupos, enquanto que seis acessos (113J - Kyuushuu, 191J - Col/Fuzui/1965, 175J - Tomoe Mochi, 391J - Kurumi Wase 43, 268J - Ookuma Nishiki e 130J - Esojima) não agruparam com os demais, sendo os únicos representantes de seu grupo (grupos X a XV). As testemunhas foram reunidas no mesmo grupo, juntamente com 79 acessos japoneses.

Variáveis categóricas e contínuas simultaneamente

Considerando-se simultaneamente as variáveis contínuas e categóricas, os acessos foram reunidos em 15 grupos (Tabela 2.9). Embora os acessos tenham sido reunidos em um mesmo número de grupos do que considerando somente as variáveis contínuas, houve mudança de acessos nos grupos. O primeiro grupo abrangeu 110 acessos (57,29% dos acessos) e as seis testemunhas, e 78 acessos foram distribuídos em dez grupos. Quatro acessos foram os mais divergentes em relação aos outros acessos, ficando sozinhos em seu grupo, o 113J - Kyuushuu que se destacou por também ficar isolado quando consideradas apenas as variáveis contínuas, os acessos 23J - Sonobe Mochi e 48J - Mie que também ficaram isolados considerando-se apenas as variáveis categóricas, e o acesso 245J - Ishiwari Mochi

que se distanciou de outros acessos quando considerou-se simultaneamente as variáveis contínuas e categóricas.

Tabela 2.7 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando as distâncias de Jaccard geradas por dez variáveis categóricas avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2007/2008

Grupo	Nº	Genótipos de arroz
I	65	2J; 3J; 6J; 8J; 12J B06; 27J; 29J; 41J; 50J; 68J; 78J; 106J; 107J; 110J; 122J; 129J; 133J; 136J; 144J; 147J; 156J; 159J; 170J; 177J; 179J; 183J; 200J; 206J; 213J; 218J; 221J; 229J; 236J; 252J; 260J; 264J; 269J; 276J; 278J; 286J; 287J; 293J; 302J; 304J; 312J; 320J; 325J; 330J; 331J; 335J; 346J; 352J; 356J; 357J; 365J; 368J; 374J; 382J; 383J; 386J; 387J; 393J; 397J; 409J; 415J
II	28	01J; 14J; 36J; 45J; 92J; 112J; 117J; 119J; 125J; 150J; 175J; 202J; 237J; 274J; 277J; 280J; 301J; 311J; 317J; 337J; 364J; 369J; 379J; 380J; 389J; 401J; 410J; 12J B07
III	43	24J; 25J; 38J; 55J; 56J; 57J; 69J; 74J; 79J; 80J; 82J; 121J; 131J; 140J; 153J; 160J; 164J; 165J; 171J; 173J; 174J; 176J; 188J; 189J; 205J; 214J; 217J; 219J; 235J; 239J; 248J; 256J; 261J; 263J; 284J; 285J; 290J; 308J; 322J; 378J; 384J; 394J; 408J
IV	14	54J; 70J; 118J; 199J; 209J; 216J; 228J; 259J; 273J; 279J; 294J; 295J; 299J; 367J
V	11	42J; 52J; 186J; 230J; 310J; 339J; 373J; 402J; 407J; 413J; 418J
VI	10	40J; 203J; 246J; 257J; 268J; 289J; 314J; 315J; 355J; 391J
VII	7	134J; SERTANEJA; CAIAPÓ; IAC 1246; IAC 201; IAC 202; CURINGA*
VIII	3	35J; 197J; 400J
IX	3	16J; 130J; 370J
X	3	113J; 127J; 139J
XI	2	245J; 336J
XII	2	338J; 395J
XIII	2	191J; 271J
XIV	1	250J
XV	1	23J
XVI	1	48J
XVII	1	172J
XVIII	1	99J

*Cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas estão identificadas em negrito

Tabela 2.8 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando as distâncias de Mahalanobis geradas por 13 variáveis contínuas avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2007/2008

Grupo	Nº	Genótipos de arroz
I	85	1J; 8J; 23J; 24J; 25J; 29J; 35J; 36J; 41J; 42J; 50J; 55J; 56J; 68J; 78J; 82J; 92J; 99J; 106J; 107J; 110J; 117J; 125J; 127J; 136J; 144J; 150J; 153J; 159J; 164J; 165J; 171J; 172J; 177J; 183J; 186J; 189J; 202J; 205J; 206J; 213J; 214J; 221J; 237J; 248J; 257J; 261J; 263J; 273J; 274J; 276J; 278J; 285J; 289J; 293J; 301J; 311J; 312J; 330J; 331J; 337J; 338J; 346J; 352J; 355J; 364J; 368J; 370J; 373J; 379J; 380J; 383J; 386J; 387J; 394J; 395J; 400J; 401J; 418J; SERTANEJA; CAIAPÓ; CURINGA; IAC 1246; IAC 201; IAC 202*
II	74	2J; 3J; 6J; 16J; 27J; 38J; 40J; 57J; 69J; 70J; 79J; 80J; 112J; 118J; 119J; 121J; 129J; 131J; 133J; 134J; 140J; 147J; 156J; 173J; 174J; 176J; 188J; 203J; 209J; 216J; 217J; 218J; 219J; 228J; 229J; 235J; 239J; 246J; 252J; 256J; 259J; 260J; 264J; 271J; 277J; 279J; 280J; 284J; 287J; 299J; 302J; 304J; 308J; 314J; 315J; 317J; 320J; 322J; 325J; 335J; 336J; 339J; 356J; 357J; 365J; 367J; 382J; 384J; 393J; 397J; 402J; 408J; 410J; 415J
III	6	45J; 48J; 54J; 230J; 269J; 294J
IV	4	122J; 407J; 52J; 409J
V	8	14J; 139J; 160J; 290J; 369J; 374J; 378J; 389J
VI	9	12J B06; 74J; 197J; 199J; 200J; 245J; 250J; 295J; 12J B07
VII	2	179J; 286J
VIII	2	170J; 310J
IX	2	236J; 413J
X	1	113J
XI	1	191J
XII	1	175J
XIII	1	391J
XIV	1	268J
XV	1	130J

* Cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas estão identificadas em negrito

Tabela 2.9 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando simultaneamente 13 variáveis contínuas e dez categóricas avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2007/2008

Grupo	Nº	Genótipos de arroz
I	116	SERTANEJA; CURINGA; CAIAPÔ; IAC 1246; IAC 201; IAC 202* ; 2J; 3J; 6J; 8J; 12J; 24J; 25J; 27J; 29J; 36J; 41J; 50J; 52J; 55J; 56J; 57J; 68J; 74J; 78J; 79J; 106J; 107J; 110J; 112J; 119J; 122J; 129J; 131J; 133J; 134J; 136J; 140J; 144J; 147J; 156J; 159J; 164J; 165J; 171J; 173J; 176J; 177J; 179J; 183J; 186J; 189J; 200J; 206J; 209J; 213J; 214J; 217J; 218J; 219J; 221J; 229J; 230J; 237J; 246J; 248J; 252J; 257J; 260J; 261J; 263J; 264J; 274J; 276J; 277J; 278J; 284J; 285J; 287J; 289J; 293J; 301J; 302J; 304J; 312J; 320J; 322J; 325J; 330J; 331J; 335J; 346J; 352J; 356J; 357J; 364J; 365J; 368J; 373J; 374J; 379J; 380J; 382J; 383J; 384J; 386J; 387J; 393J; 394J; 397J; 407J; 408J; 409J; 410J; 415J; 418J
II	18	01J; 14J; 92J; 117J; 125J; 127J; 139J; 150J; 172J; 175J; 202J; 311J; 337J; 369J; 389J; 400J; 401J; 12J B07
III	25	38J; 45J; 54J; 69J; 70J; 80J; 118J; 121J; 188J; 199J; 216J; 228J; 235J; 239J; 256J; 259J; 279J; 280J; 294J; 295J; 299J; 308J; 367J; 395J; 402J
IV	8	82J; 153J; 160J; 191J; 205J; 250J; 290J; 378J
V	6	42J; 174J; 271J; 310J; 336J; 339J
VI	7	40J; 170J; 203J; 268J; 269J; 314J; 315J
VII	3	16J; 130J; 317J
VIII	5	35J; 99J; 197J; 355J; 391J
IX	2	273J; 370J
X	2	338J; 413J
XI	2	236J; 286J
XII	1	113J **
XIII	1	23J
XIV	1	245J
XV	1	48J

* Cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas estão identificadas em negrito

** Acessos em negrito e itálico também não agruparam com os demais acessos quando consideradas apenas variáveis categóricas ou contínuas na análise de agrupamento

Correlação entre as matrizes obtidas para o primeiro ano de avaliação

As matrizes obtidas pela distância de Mahalanobis para as variáveis contínuas e pelo complemento aritmético de Jaccard para as variáveis categóricas apresentaram correlação de 0,147 ($p < 0,01$) pelo teste de Mantel. A correlação entre a matriz gerada pelas variáveis contínuas e categóricas consideradas simultaneamente e cada matriz isoladamente apresentou correlação significativa de 0,757.

2.3.2 Características avaliadas no ano agrícola 2008/2009

No segundo ano agrícola foram avaliadas apenas as características que apresentaram maior contribuição para a variabilidade detectada no primeiro ano, sendo elas: NDF, CC, APM, CP, CFB, LFB e NDM. A produtividade de grãos também foi avaliada pela sua importância agronômica.

Foram observadas diferenças significativas entre acessos para todas as características avaliadas no ano agrícola 2008/2009. O resultado do teste F e as estatísticas descritivas para as características avaliadas são sumarizadas na Tabela 2.10.

Os acessos japoneses quando comparados às cultivares comerciais utilizadas como testemunhas no primeiro ano de avaliação agromorfológica apresentaram em média, maior precocidade, refletida em valores menores para NDF e NDM. Os acessos apresentaram maior CC e APM do que as testemunhas, porém, as testemunhas apresentaram maior CP, o que fez com que a diferença apresentada entre acessos e testemunhas para CC diminuísse quando considerada a APM.

Observaram-se acessos com valores menores e também maiores do que aqueles observados para as testemunhas para todas as características avaliadas.

Tabela 2.10 - Resumo da análise de variância, média e valores extremos para as oito características avaliadas no ano agrícola 2008/2009 em 192 acessos japoneses de arroz e seis cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas

FV	GL	QM							
		NDF	CC	APM	CP	CFB	LFB	NDM	PG
Blocos	5	27,968	93,960	85,055	16,151	23,733	0,149	31,284	0,067
Genótipos (aj)	197	122,963**	139,653**	157,969**	5,177*	12,806*	0,0496*	123,884**	0,0345*
Resíduo	25	6,32	24,062	29,258	2,713	9,486	0,022	6,61	0,017
CV (%)		2,52	5,63	4,96	7,47	10,83	8,04	1,93	22,42
Média geral		99,57	87,06	109,1	22,04	28,45	1,86	133,526	0,579
Média A		98,33	87,73	109,4	21,68	28,58	1,86	132,260	0,576
Máximo (A)		149,56 (219J)	130,86 (250J)	151,90 (250J)	33,33 (401J)	40,89 (401J)	2,48 (367J)	183,61 (269J)	1,14 (218J)
Mínimo (A)		82,39 (206J)	64,25 (317J)	82,63 (317J)	16,88 (395J)	20,10 (221J)	1,34 (331J)	114,11 (287J)	0,089 (200J)
Média T		106,22	83,52	107,51	23,99	27,72	1,85	140,277	0,591
Máximo (T)		108,33 (202, CAI, CUR)	97,99 (1246)	122,07 (1246)	24,85 (SER)	30,76 (1246)	1,96 (SER)	143,17 (CUR)	0,634 (CAI)
Mínimo (T)		101,33 (SER)	74,38 (CUR)	97,175 (CUR)	22,8 (CUR)	23,10 (CUR)	1,61 (CUR)	135,33 (SER)	0,501 (CUR)

*, **: significativo a 5 e 1% pelo teste F, respectivamente

Estimativas da variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genotípica (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genética (CVg) e relação CVg/CVe para as oito características avaliadas no segundo ano são apresentadas na Tabela 2.11.

A estimativa do CVg foi maior para produtividade de grãos e menor para comprimento da folha bandeira e a relação CVg/CVe mostrou que existe situação favorável à seleção (valores maior que 1) em 6 das 8 características avaliadas. Comprimento da panícula e comprimento da folha bandeira apresentaram valores menores que 1. A herdabilidade variou de 31,48% para comprimento da folha bandeira e 94,57% para número de dias para o florescimento.

Tabela 2.11 - Variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genética (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genética (CVg) e CVg/CVe para oito características avaliadas em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz no ano agrícola 2008/2009

Característica	σ_p^2	σ_e^2	σ_g^2	h^2	CVg(%)	CVg/CVe
Dias para o florescimento	116,295	6,32	109,975	94,565	10,664	4,171
Comprimento do colmo	132,352	24,062	108,290	81,819	11,862	2,121
Altura da planta na maturidade	158,295	29,258	129,036	81,516	10,383	2,100
Comprimento da panícula	5,319	2,713	2,605	48,979	7,446	0,979
Comprimento da folha bandeira	13,845	9,486	4,358	31,481	7,304	0,677
Largura da folha bandeira	0,0508	0,0224	0,0284	55,936	9,052	11,267
Dias para a maturidade	116,581	6,61	109,971	94,33	7,928	4,078
Produtividade de grãos	0,0390	0,0168	0,0222	56,895	25,861	1,148

2.3.3 Análises considerando os dois anos de avaliação

Na análise de variância conjunta para os dois anos agrícolas 2007/2008 e 2008/2009, detectou-se diferença significativa entre acessos para as oito características contínuas avaliadas nos dois anos agrícolas (Tabela 2.12). Para ano agrícola, houve diferença para sete das oito características avaliadas, sendo não significativo apenas para largura da folha bandeira. No ano 2007/2008 os genótipos apresentaram menor ciclo, menor altura de planta, e maior produtividade de grãos do que no ano 2008/2009. Também foi detectada interação genótipo por ano para cinco das oito características avaliadas.

Tabela 2.12 - Resumo da análise de variância conjunta para oito características contínuas avaliadas nos anos agrícolas 2007/2008 e 2008/2009 em 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz

FV	GL	QM							
		NDF	CC	APM	CP	CFB	LFB	NDM	PG
Ano (A)	1	2657,594**	10112,39**	12578,42**	128,854**	0,966 ^{ns}	2,240**	5747,694**	0,9737**
Bloco (ano)	10	18,147*	77,070**	97,543**	4,681*	14,830**	0,0238 ^{ns}	20,036**	0,0462*
Genótipo (G)	197	203,218**	208,178**	228,530**	6,088**	21,078*	0,0916**	177,178**	0,0496**
A x G	197	14,110**	48,479**	59,187**	2,608 ^{ns}	10,483**	0,0133 ^{ns}	16,695**	0,0236 ^{ns}
Resíduo	50	6,747	23,281	29,067	2,139	6,939	0,0137	5,909	0,0226
CV (%)		2,68	5,89	5,23	6,84	9,13	6,51	1,88	23,69
Média 2 anos		97,04	81,81	103,17	21,37	28,84	1,79	129,65	0,635
Média									
2007/2008		94,50	76,56	97,25	20,69	29,23	1,73	125,776	0,691
Média									
2008/2009		99,57	87,06	109,1	22,04	28,45	1,86	133,526	0,579

*, **: significativo a 5 e 1% pelo teste F, respectivamente e ^{ns}: não significativo

As matrizes de distância de Mahalanobis geradas para as variáveis contínuas em cada ano agrícola e a matriz do complemento do coeficiente de Jaccard obtida pela análise das variáveis categóricas foram padronizadas e somadas, para a obtenção de uma única matriz resumindo as informações de distância detectadas entre os acessos. A partir dessa matriz soma foi realizado o agrupamento de Tocher, que permitiu a identificação de 21 grupos (Tabela 2.13). Os acessos 199J - Kahee, 228J - Tariu Saku Mochi, 389J - Igisu Mochi, 197J - Toga, 407J - Edogawa e 260J - Kozo (grupos XVI a XXI) não agruparam com outros acessos. O maior grupo (grupo I) foi composto por 106 acessos japoneses enquanto que o segundo maior grupo foi constituído por 17 acessos japoneses e pelas seis cultivares comerciais utilizadas como testemunhas. Os demais acessos foram distribuídos em outros grupos.

Tabela 2.13 - Agrupamentos determinados pelo algoritmo de otimização de Tocher considerando simultaneamente variáveis categóricas e contínuas avaliadas em dois anos agrícolas

Grupo	Nº	Genótipos de arroz
I	106	1J; 8J; 23J; 35J; 36J; 41J; 42J; 55J; 56J; 68J; 82J; 92J; 99J; 106J; 107J; 150J; 171J; 172J; 183J; 186J; 189J; 214J; 221J; 263J; 274J; 276J; 285J; 293J; 301J; 312J; 330J; 346J; 352J; 355J; 364J; 368J; 373J; 379J; 380J; 400J; 401J; 418J; 2J; 16J; 27J; 38J; 40J; 57J; 69J; 70J; 80J; 112J; 119J; 121J; 129J; 131J; 133J; 140J; 147J; 174J; 176J; 188J; 209J; 235J; 239J; 246J; 252J; 259J; 271J; 277J; 280J; 284J; 287J; 302J; 314J; 317J; 320J; 322J; 325J; 335J; 336J; 339J; 356J; 357J; 365J; 382J; 384J; 402J; 408J; 410J; 415J 122J; 52J; 409J 179J; 286J; 175J; 268J; 413J; 170J; 310J; 12J B06; 74J; 295J; 160J; 45J
II	14	29J; 156J; 50J; 213J; 217J; 304J; 278J; 25J; 153J; 257J; 165J; 236J; 191J; 308J
III	23	SERTANEJA; CAIAPÓ; CURINGA; IAC 1246; IAC 201; IAC 202* ; 290J; 394J; 337J; 202J; 177J; 264J; 279J; 229J; 12J B07; 299J; 134J; 378J; 250J; 117J; 374J; 205J; 79J
IV	6	164J; 289J; 261J; 127J; 219J; 136J
V	11	216J; 14J; 237J; 294J; 110J; 139J; 118J; 256J; 311J; 367J; 3J
VI	8	273J; 369J; 159J; 130J; 125J; 78J; 395J; 391J
VII	3	245J; 269J; 200J
VIII	3	144J; 203J; 338J
IX	3	387J; 386J; 218J
X	3	393J; 248J; 173J
XI	3	383J; 6J; 24J
XII	2	113J; 54J
XIII	3	315J; 331J; 397J
XIV	2	370J; 206J
XV	2	48J; 230J
XVI	1	199J
XVII	1	228J
XVIII	1	389J
XIX	1	197J
XX	1	407J
XXI	1	260J

* Cultivares brasileiras utilizadas como testemunhas estão identificadas em negrito

Correlação entre todas as matrizes obtidas

A matriz soma obtida, considerando variáveis contínuas, categóricas e os dois anos agrícolas, apresentou uma correlação alta e significativa com todas as matrizes que lhe deram origem (Tabela 2.14), enquanto que as demais matrizes apresentaram correlação baixa entre si.

Tabela 2.14 - Correlação entre as matrizes de dissimilaridade de 192 acessos japoneses e seis cultivares brasileiras de arroz obtidas para variáveis categóricas (ano agrícola 2007/2008) e contínuas (anos agrícolas 2007/2008 e 2008/2009) e por soma de matrizes

Matrizes de dissimilaridade	Mahalanobis 07/08	Jaccard 07/08	Mahalanobis 08/09	Soma
Mahalanobis 07/08	-	0,1461**	-0,0122	0,6349**
Jaccard 07/08		-	-0,0395*	0,6197**
Mahalanobis 08/09			-	0,5311**
Soma				-

*, **: significativo a 5 e 1% respectivamente

2.4 Discussão

Variabilidade dos acessos

O êxito nos programas de melhoramento é diretamente dependente da variabilidade genética e de médias altas para os caracteres de interesse. O primeiro passo para se ampliar a base genética nas variedades melhoradas é a caracterização de variedades tradicionais a nível fenotípico, o que revela importantes características de interesse para os melhoristas (SINGH, 1989). A avaliação e o entendimento da extensão da variabilidade genética existente em bancos de germoplasma são importantes e permitem a utilização efetiva dos acessos em programas de melhoramento.

Os acessos japoneses apresentaram variabilidade para as características estudadas, tanto para variáveis categóricas (Tabela 2.3) como para variáveis contínuas (Figura 2.3 e Tabelas 2.4 e 2.12). Para a maioria das características, as estimativas de herdabilidade foram de média a alta (Tabelas 2.5 e 2.11) e a relação

CVg/CVe foi maior que um para 11 das 13 características avaliadas no primeiro ano e para seis das oito avaliadas no segundo ano. Esses valores indicam condições favoráveis para a seleção e possibilita consideráveis ganhos genéticos (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992).

Características de planta

A maior parte dos acessos é semi-anã (Figura 2.3), característica desejada em programas de melhoramento da cultura. A baixa altura de planta observada nos acessos japoneses contrasta com relatos da literatura no estudo de que variedades tradicionais coletadas na Costa do Marfim, na África (SANNI et al., 2008), de acessos filipinos de arroz do Banco de Germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ (MATA, 2010) e de variedades aromáticas do Afeganistão, Camboja, Índia, Myanmar e Vietnã (HIEN et al., 2007), nos quais a maioria dos genótipos foram altos. A média de altura de planta observada para todos os acessos japoneses estudados foi de 103 cm, variando de 66,02 a 142,91 cm no ano agrícola 2007/2008 (Tabela 2.4) e de 82,63 a 151,90 no ano agrícola 2008/2009 (Tabela 2.10). Padrão similar (média de 101,53 cm e variação de 65 a 130,4 cm) foi observado em variedades tradicionais paquistanesas (ZAFAR et al., 2004). A amplitude observada para altura de planta foi menor do que a observada em variedades tradicionais coletadas na região de Yunnan, China, um dos centros de diversidade do arroz, onde a altura de planta variou de 52 a 210 cm (ZENG et al., 2003).

Mais de 80% dos acessos apresentaram limbo pubescente, característica que auxilia na identificação da subespécie Japônica (GLASZMANN, 1987). Cerca de metade dos acessos apresentou pubescência do limbo intermediária. Os demais acessos foram divididos na mesma proporção entre ausência de pubescência, pubescência escassa e forte. Quanto ao ângulo de inserção da folha bandeira, a classe intermediária abrangeu 68,18% de acessos, e o ereto 23,75%, com poucos acessos tendo folhas horizontal e descendente. O ângulo de inserção da folha bandeira apresenta grande contribuição para o enchimento de grãos, suprimindo produtos fotossintéticos principalmente para a panícula (YOSHIDA, 1981). A razão fotossintética de folhas eretas ou com inserção intermediária é maior do que para folhas horizontais e descendentes de forma que genótipos com essa característica apresentam potencial para alta produtividade (HIEN et al., 2007).

O comprimento da folha bandeira variou de 16,04 a 40,07cm para o ano agrícola 2007/2008 e de 20,10 a 40,89 cm em 2008/2009, com média de 28,5 cm para todos os acessos. Para largura, a variação foi de 1,17 a 2,42 cm, e de 1,34 a 2,48 cm para cada ano agrícola, com média de 1,78 cm. As médias foram inferiores as das testemunhas, tanto para comprimento (33,05 cm) quanto para largura da folha bandeira (1,85 cm). A amplitude observada pelos acessos foi menor do que a relatada para acessos de Yunnan, que apresentaram comprimento variando de 10 a 65 cm e largura de 0,7 a 3 cm (ZENG et al., 2003).

Precocidade

Os acessos floresceram em média, oito dias antes que as testemunhas, para os dois anos agrícolas (Tabelas 2.4 e 2.10). Cerca de 73% dos acessos apresentaram ciclo intermediário (116 a 130 dias), enquanto poucos acessos precoces, tardios e muito tardios (7%, 17% e 3%, respectivamente) foram identificados. Padrões de distribuição similares foram observados em acessos africanos (SANNI et al., 2008) e paquistaneses (ZAFAR et al., 2004). Número de dias para o florescimento seguiu o mesmo padrão de distribuição (Figura 2.3). Acessos filipinos do Banco de germoplasma da ESALQ, que apresentaram média de 120 dias para o florescimento (MATA, 2010) foram mais tardios que os acessos japoneses, que apresentaram média de 93 dias em 2007/2008 e 98 dias até o florescimento em 2008/2009.

Características do grão

Os acessos japoneses apresentam grãos largos, e mais curtos do que as cultivares utilizadas como testemunhas. O comprimento variou de 6,71 a 9,91mm, com média de 8,3 mm, enquanto a largura variou de 2,5 a 3,89 mm, com média de 3,4 mm. Essa amplitude de variação é menor do que a observada entre variedades tradicionais de Yunnan, em que o comprimento de grão variou de 5 a 13 mm e a largura variou de 2,4 a 4,9 mm (ZENG et al., 2003). A partir disso, podemos dizer que os acessos japoneses abrangem somente parte da variabilidade para características do grão. Isso pode estar relacionado a processos de seleção para o tipo de grão preferido em cada país. Hien et al. (2007) observaram que o nível de variação e distribuição dos caracteres para grão foram diferentes para os países de onde as cultivares utilizadas em seu estudo foram originárias. Enquanto grãos

extralongos foram predominantes para variedades do Afeganistão, Camboja, Índia e Tailândia, grãos longos foram mais frequentes em cultivares do Vietnã e grãos médios em cultivares do Myanmar. Grãos curtos foram observados em apenas 5% das variedades e apenas para originárias do Afeganistão e Myanmar (HIEN et al., 2007). Comparando-se o Japão, de onde os acessos são originários e a preferência é por grãos curtos a intermediários e largos, e o Brasil, de onde as testemunhas utilizadas são originárias, a diferença entre as testemunhas e os acessos é explicada, pois no Brasil os programas de melhoramento focaram na seleção para qualidade de grãos, sendo que o germoplasma elite da Embrapa Arroz e Feijão atingiu recentemente uma relativa uniformidade dos grãos na classe longo-fino (BRESEGHELLO et al., 2006). A maioria dos acessos japoneses apresentou comprimento intermediário, padrão similar observado no conjunto de variedades africanas avaliadas por Sanni et al. (2008), em que 70% apresentaram grãos de comprimento médio, 24% apresentaram grãos longos e 6% tiveram curtos.

A massa de cem sementes variou de 1,99 a 3,8 g, com média de 2,98 g. A maior parte dos acessos apresentou valores em torno da média, com poucos acessos apresentando valores próximos aos extremos. Zeng et al. (2003) observaram valores de 20 a 52 g para massa de 1000 grãos, o que corresponde a variação de 2 a 5,2 g para massa de 100 grãos em variedades tradicionais de Yunnan. A exemplo do que foi observado para comprimento e largura do grão, os acessos japoneses apresentaram menor amplitude de variação para massa de cem sementes, cujos valores correspondem aos valores mais baixos da distribuição para variedades tradicionais de Yunnan. Isso é consequência de menores valores para comprimento e largura de grão observado nos acessos japoneses. Comparados com acessos africanos, que apresentaram na sua maioria variação de 2 a 4 g para massa de 100 grãos (SANNI et al., 2008), os níveis de variação são similares. Se fossem separados em classes de massa de 100 grãos em leve, intermediário e pesado, todos os acessos japoneses pertenceriam à classe intermediária, constituindo pouca variabilidade para essa característica.

Mais da metade dos acessos caracterizaram-se pela ausência de arista, e ao se considerar os acessos parcialmente aristados com arista curta, cerca de 83 % dos acessos vão da ausência de arista a parcialmente aristados com aristas curtas. A predominância de acessos sem aristas ou com poucas aristas pode estar

relacionada com fatores seletivos para produtividade e manuseio pós-colheita (HIEN et al., 2007). Essa proporção sugere a presença de seleção para essa característica nesse conjunto de acessos, pois a presença de arista em arroz selvagem é considerada uma característica vantajosa por conferir proteção contra ataques de animais e desempenhar um importante papel na dispersão de sementes (TAKAHASHI et al., 1986). Menos de 10% dos acessos foram completamente aristados e com arista longa. Mesmo com pequena proporção de acessos aristados, diferentes cores foram observadas (Tabela 2.3 e Figura 2.2).

A variabilidade encontrada nos acessos aliada à boa performance agrônômica para algumas características de interesse agrônômico como arquitetura de planta e bons níveis de produtividade, sugere que os acessos apresentam potencial para serem utilizados na ampliação da base genética em programas de melhoramento.

A redução dos ganhos genéticos observados nos programas de melhoramento de arroz indica que novas alternativas de melhoramento devem ser empreendidas (HOSSAIN, 2007; BRESEGHELLO et al., 2006; SOUZA et al., 2007). Incremento nos níveis de produtividade depende da variabilidade genética disponível para se realizar a seleção e a ampliação da variabilidade genética nos programas de melhoramento dá-se principalmente pela utilização de germoplasma exótico e introduzido de outras regiões. Além da alta variabilidade genética, é importante que o germoplasma introduzido apresente características agrônômicas favoráveis aliadas a bons níveis de produtividade e à adaptação às condições de cultivo onde está sendo introduzido. As cultivares japonesas de arroz avaliadas nesse trabalho apresentaram bom desempenho agrônômico, adaptando-se as condições de cultivo de sequeiro no Brasil. Além disso, apresentaram variabilidade genética para as características avaliadas, tanto para variáveis contínuas (Tabela 2.4 e Figura 2.3) como categóricas (Tabela 2.3), podendo contribuir para o aumento da base genética dos programas de melhoramento da cultura no país.

Contribuição das características para a variabilidade

A análise de variáveis canônicas utilizada para resumir a informação da variabilidade encontrada entre os acessos para variáveis contínuas permite a identificação dos descritores que mais contribuem para a variabilidade observada

entre os acessos (CRUZ; CARNEIRO, 2003). As quatro primeiras variáveis canônicas responderam pela maior parte (93,66%) da variabilidade observada, de forma que as características que apresentaram maior importância relativa para essas variáveis são as que apresentam maior contribuição para a diversidade entre os acessos. De acordo com este estudo as características número de dias para o florescimento, número de dias para a maturidade, comprimento do colmo e altura de planta, comprimento e largura da folha bandeira (Tabela 2.6) devem merecer destaque e ter sua utilização preconizada em trabalhos de diversidade agromorfológica em arroz. Resultados semelhantes foram encontrados por Sanni et al. (2008) estudando o padrão de variação geográfica e morfológica de 880 variedades tradicionais de arroz na Costa do Marfim, onde os autores observaram que a análise discriminante mostrou que características como comprimento da panícula, tamanho da semente (comprimento e largura), número de dias para o florescimento e maturidade foram as características que mais contribuíram para a diversidade fenotípica. A análise discriminante canônica foi utilizada em estudo de germoplasma em escala global e as principais características discriminantes incluíram quatro caracteres morfológicos de planta - número de panículas por planta, comprimento da panícula, altura da planta e largura da folha bandeira, e quatro caracteres de semente - comprimento, relação comprimento e largura, massa e volume de semente (ALI et al., 2011). Neste estudo, características de semente não apresentaram grande contribuição para a variabilidade. Para características de semente, os acessos japoneses abrangem somente parte da variabilidade observada globalmente, com a maioria dos acessos apresentando comprimento e massa de cem sementes intermediários (Figura 2.3).

Agrupamento

O agrupamento dos acessos por técnicas multivariadas é importante para a manutenção do germoplasma, para sua utilização, e para a determinação de acessos mais divergentes que potencialmente gerariam populações com maior variabilidade genética (CRUZ; CARNEIRO, 2003). A análise de agrupamento permitiu identificar vários grupos de acessos similares, tanto para variáveis categóricas (Tabela 2.7) como para contínuas (Tabela 2.8), e considerando-se simultaneamente todas as variáveis avaliadas em um ano agrícola (Tabela 2.9) e em

diferentes anos agrícolas (Tabela 2.15). Os resultados da análise de agrupamento corroboram com a variabilidade observada quando todas as características avaliadas foram analisadas isoladamente. Entretanto, os agrupamentos originários separadamente de variáveis contínuas e o de variáveis categóricas não são consistentes. Isso porque as matrizes de dissimilaridade para os dois tipos de variáveis apresentaram baixa correlação (Tabela 2.16). Hoogerheide (2009) também observou inconsistência em agrupamentos gerados por variáveis contínuas e categóricas em acessos de alho. A matriz de dissimilaridade entre os acessos japoneses obtida com a soma das matrizes originárias de variáveis contínuas, categóricas e dos dois anos agrícolas, apresentou uma correlação alta e significativa com todas as matrizes que lhe deram origem (Tabela 2.16), sugerindo que quando os dois tipos de variáveis são considerados simultaneamente o agrupamento é mais consistente e condizente com a real dissimilaridade entre os acessos.

As testemunhas foram reunidas em um grupo diferente dos acessos quando consideradas somente as variáveis categóricas (Tabela 2.7), mas quando foram consideradas simultaneamente as variáveis contínuas e categóricas em um ano de cultivo, as testemunhas foram agrupadas com 110 acessos japoneses (Tabela 2.9), e em avaliações de dois anos de cultivo foram agrupadas com 17 acessos (Tabela 2.15).

Embora os acessos deste estudo tenham sido avaliados em dois anos agrícolas e no mesmo local, e avaliações em um maior número de locais são necessárias para elucidar a adaptação dos acessos a ambientes específicos, os resultados sugerem que a interação genótipo por ambiente afeta o desempenho dos acessos e a estrutura de agrupamento em análises de diversidade. A interação genótipo por ano foi significativa para cinco das oito características avaliadas em dois anos agrícolas (Tabela 2.14). Outros estudos também relataram interação significativa para características avaliadas em diferentes ambientes em germoplasma de painço (*switchgrass*) para produção de biomassa (HOPKINS et al., 1995), de cevada para produtividade e componentes da produtividade (RODRIGUEZ et al., 2008) e de arroz para produtividade e características de grão (BRONDANI et al., 2006). A presença de interação sugere que a seleção de melhores genótipos para determinado ambiente deve levar em consideração características genotípicas

e fatores ambientais que determinam adaptação específica a determinados ambientes (RODRIGUEZ et al., 2008). A influência da interação genótipo por ano para as características avaliadas nos acessos japoneses é refletida nas análises de agrupamento, com diferenças nos grupos formados quando na análise de agrupamento foram consideradas as características avaliadas no segundo ano (Tabela 2.15) ao invés de somente as características avaliadas no primeiro ano (Tabela 2.9). Diferentes padrões de agrupamento também foram observados em acessos de alho avaliados em diferentes ambientes (HOOGERHEIDE, 2009).

Os resultados deste trabalho indicam que entre os acessos japoneses estudados existe variabilidade genética, diferentes respostas a variações ambientais e características desejáveis agronomicamente. Assim, alguns acessos possuem potencial para serem utilizados na ampliação da base genética em programas de pré-melhoramento e melhoramento da cultura.

Referências

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

ALMANZA-PINZON, M.I.; KHAIRULLAH, M.; FOX, P.N.; WARBURTON, M.L. Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, p. 77–86, 2003.

ATLIN, G.N.; LAFITTE, H.R.; TAO, D.; LAZA, M.; AMANTE, M.; COURTOIS, B. Developing rice cultivars for high-fertility upland systems in the Asian tropics. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 97, p. 43–52, 2006.

BAJRACHARYA, J.; STEELE, K.A.; JARVIS, D.I.; STHAPIT, B.R.; WITCOMBE, J.R. Rice landrace diversity in Nepal: Variability of agro-morphological traits and SSR markers in landraces from a high-altitude site. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 95, p. 327–335, 2006.

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

BRESEGHELLO, F.; CASTRO, E.M. de; MORAIS, O.P. de. **Progressos genéticos pelo melhoramento do arroz de terras altas da Embrapa para os estados de**

Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Piauí e Mato Grosso. Goiânia: EMBRAPA, CNPAF, 2006. 24 p. (EMBRAPA. CNPAF. Documentos, 20).

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

CLEYTON, S.; NEVES, P.C. Country Snapshot: Brazil. **Rice Today**, Manila, v. 10, p. 16-17, 2011.

COOPER, M.; BYTH, D.E. Understanding plant adaptation to achieve systematic applied crop improvement: a fundamental challenge. In: COOPER, M.; HAMMER, G.L. (Ed.). **Plant adaptation and crop improvement.** Wallingford: CABI, 1996. chap. 2, p. 5-23.

CROSSA, J.; FRANCO, J. Statistical methods for classifying genotypes. **Euphytica**, Wageningen, v. 137, p. 19-37, 2004.

CRUZ, C.D. **Programa Genes:** versão windows. Viçosa: Editora UFV, 2001. 642 p.

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

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

FAO. **STAT: food and agricultural commodities production.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 24 nov. 2011.

FUFA, H.; BAENZIGER, P.S.; BEECHER, B.S.; DWEIKAT, I.; GRAYBOSCH, R.A.; ESKRIDGE, K.M. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. **Euphytica**, Wageningen, v. 145, p. 133–146, 2005.

GLASZMANN, J.C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 74, p. 21–30, 1987.

HIEN, N.L.; SARHADI, W.A.; OIKAWA, Y.; HIRATA, Y. Genetic diversity of morphological responses and the relationships among Asia aromatic rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Tropics**, Tsukuba, v. 16, p. 343-355, 2007.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; REEVES, T.; RIBAUT, J.; SKOVMAND, B.; TABA, S.; Warburton, M. Plant genetic resources: what can they contribute

toward increased crop productivity? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 5937–5943, 1999.

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

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

HORNIK, K. **R FAQ**. <Disponível em: <http://cran.r-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>>. Acesso em: 10 out. 2011.

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

HOYT, E. **Conserving the wild relatives of crops**. Rome: IBPGR; IUCN; WWF, 1988. 45 p.

HUMPHREYS, M.O. A genetic approach to the multivariate differentiation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars. **Heredity**, London, v. 66, p. 437–443, 1991.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Descriptors for rice (*Oryza sativa* L.)**. Manila, 1980. 21 p.

_____. **Terminology for rice growing environments**. Manila, 1984. 38 p.

_____. **World rice statistics**. Disponível em: <<http://irri.org/our-science/targeting-and-policy/world-rice-statistics>>. Acesso em: 25 nov. 2011.

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

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

MATA, T.L. **Diversidade genética em germoplasma de arroz filipino identificada por marcadores moleculares e caracteres agromorfológicos**. 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

OKA, H.I. **Origin of cultivated rice**. Tokyo: Japan Science Society Press, 1988. 254 p.

PATRA, B.C.; DHUA, S.R. Agro-morphological diversity scenario in upland rice germplasm of Jeypore tract. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, p. 825–828, 2003.

PINHEIRO, B.S.; CASTRO, E.M. de; GUIMARÃES, C.M. Sustainability and profitability of aerobic rice production in Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 97, p. 34-42, 2006.

QI, Y.; ZHANG, D.; ZHANG, H.; WANG, M.; SUN, J.; WEI, X.; QIU, Z.; TANG, S.; CAO, Y.; WANG, X.; LI, Z. Genetic diversity of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in China and the temporal trends in recent fifty years. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 51, p. 681-688, 2006.

RODRIGUEZ, M.; RAU, D.; PAPA, R.; ATTENE, G. Genotype by environment interactions in barley (*Hordeum vulgare* L.): different responses of landraces, recombinant inbred lines and varieties to Mediterranean environment. **Euphytica**: Wageningen, v. 163, p. 231-247, 2008.

SANNI, K.A.; FAWOLE, I.; GUEI, R.G.; OJO, D.K.; SOMADO, E.A.; TIA, D.T.; OGUNBAYO, S.A.; SANCHEZ, I. Geographical patterns of phenotypic diversity in *Oryza sativa* landraces of Côte d'Ivoire. **Euphytica**, Wageningen, v. 160, p. 389-400, 2008.

SINGH, S.; PRADHAN, S.K.; VIRK, P. Genetic divergence in new plant type rice under shallow lowland ecosystem. **SABRAO Journal of Breeding and Genetics**, Manila, v. 40, p. 1–8, 2008.

SINGH, S.P. Pattern of variation in cultivated dry bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 31, p. 180–182, 1989.

SOUZA, M.A.; MORAIS, O.P.; HERÁN, R.E.; CARGNIN, A.; PIMENTEL, A.J.B. Progresso genético do melhoramento de arroz de terras altas no período de 1950 a 2001. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 371-376, 2007.

STATSOFT. **Electronic statistics textbook**. Disponível em: <<http://www.statsoft.com/textbook/>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

TAKAHASHI, N. Seed germination and seedling growth. In: TSUNODA, S.; TAKAHASHI, N. (Ed.). **Biology of rice**. Amsterdam: Elsevier, 1984. chap. 3, p. 71–88.

TAKAHASHI, N.; ALTERFA, H.A.H.; SATO, T. Significant role of awn in rice plants (1). A survey for agricultural value of rice awn. **Reports of the Institute for Agricultural Research**, Tohoku, v. 35, p. 21–31, 1986.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento:** componentes da variação fenotípica. Análise em um ambiente. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

YOSHIDA, S. Growth and development of rice plant. In: _____. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: The International Rice Research Institute, 1981. chap. 1, p. 1-61.

ZAFAR, N.; AZIZ, S.; MASOOD, S. Phenotypic DIVERGENCE FOR AGRO-MORPHOLOGICAL TRAITS AMONG LANDRACE GENOTYPES OF RICE (*Oryza sativa* L.) from Pakistan. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 6, p. 335-339, 2004.

ZENG, Y.; SHEN, S.; LI, Z.; YANG, Z.; WANG, X.; ZHANG, H.; WEN, G. Ecogeographic and genetic diversity based on morphological characters of indigenous rice (*Oryza sativa* L.) in Yunnan, China. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, p. 567–577, 2003.

3 DIVERSIDADE GENÉTICA MOLECULAR EM GERMOPLASMA DE ARROZ JAPONÊS UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES ANÔNIMOS E EXPRESSOS (SSRs E EST-SSRs)

Resumo

O conhecimento da diversidade genética e da estrutura populacional das variedades tradicionais mantidas em bancos de germoplasma é de fundamental importância para a sua efetiva utilização em programas de melhoramento. O Banco de Germoplasma de arroz do Departamento de Genética da ESALQ contém um grupo de 192 acessos japoneses que foram estudados com o objetivo de entender a diversidade e estruturação genética. A caracterização molecular dos acessos foi feita com base em 24 marcadores microssatélites (12 SSRs genômicos e 12 EST-SSRs) que detectaram um total de 181 alelos, 38 dos quais foram exclusivos e distribuídos em 26 acessos. O número de alelos por loco variou de 2 a 16, com média de 7,54. A diversidade gênica média apresentada pelos acessos foi de 0,59 para os SSRs genômicos e de 0,46 para os EST-SSRs. Um total de 11 variedades pertencentes aos grupos Indica, Japonica temperado, Japonica tropical e Aromático foram incluídas como padrões para as análises de diversidade genética e estrutura populacional. Essas análises caracterizaram os acessos japoneses como 98,4% pertencentes à subespécie Japonica e na sua maioria, altamente divergentes aos padrões utilizados no estudo.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; Caracterização molecular; Banco de germoplasma; Estrutura populacional; Marcadores microssatélites

Abstract

The knowledge of genetic diversity and population structure of germplasm banks is instrumental for their effective utilization in breeding programs. The 192 Japanese rice accessions maintained at the Rice Germplasm Bank of Genetics Department – ESALQ/USP were studied to understand their genetic diversity and structure using 24 microsatellite markers (12 genomic SSRs and 12 EST-SSRs). A total of 181 alleles were detected, 38 of them were private and distributed along 26 accessions. Alleles per locus mean was 7,54, ranging from 2 to 16. Genetic diversity was 0,59 for genomic SSRs and 0,46 for EST-SSRs. Varieties belonging to *Indica*, *Japonica temperado*, *Japonica tropical* and *aromatic* groups were included as patterns for genetic diversity and structure analyses. Analyses detected the Japanese accessions as 98,4% belonging to *japonica* subspecies and most of them were different from the varieties used as pattern.

Keywords: *Oryza sativa*; Molecular characterization; Germplasm; Populational structure; Microsatellite markers

3.1 Introdução

O rápido aumento da população mundial está gerando uma crescente demanda por alimentos e o aumento da produção de arroz (*Oryza sativa* L.), que ocupa posição de destaque entre os cereais cultivados e é o principal alimento para mais da metade da população mundial, terá um papel fundamental na garantia da segurança alimentar (FAN, 2011).

Enquanto a maior parte do arroz produzido vem de variedades modernas altamente produtivas, variedades tradicionais mantidas em bancos de germoplasma têm grande importância como recursos genéticos para ampliação da base genética em programas de melhoramento. Essas variedades tradicionais são valiosos recursos por conterem diversidade genética e ao mesmo tempo complementarem o *pool* gênico de cultivares melhoradas recentemente. Elas representam um estágio intermediário de domesticação entre um ancestral selvagem e as variedades modernas, e servem de reservatório da variabilidade (LONDO et al., 2006).

Acredita-se em geral que as duas subespécies de arroz, Indica e Japônica, são produtos de separados eventos de domesticação de *Oryza rufipogon* Griff. Essa evidência vem de estudos de características bioquímicas (SECOND, 1982) e esterilidade de híbridos e subsequentemente confirmadas por análises moleculares (CHENG et al., 2003), especialmente análises evolucionárias de alguns genes com influência na domesticação (LI et al., 2006; KONISHI et al., 2006; revisão em KOVACH et al., 2007). Entretanto, estudos usando um grande número de cultivares indicaram que algumas variedades não pertencem a nenhum dos dois tipos, mas estão relacionadas com a diferenciação sazonal, disponibilidade de água no solo (ZHANG et al. 2007), ou ecótipos geográficos (GLASZMANN, 1987; SANO; MORISHIMA, 1992). Usando análises de estrutura populacional, Garriss et al. (2005) dividiu *O. sativa* em cinco grupos distintos, Indica, Japônica temperado, Japônica tropical, Aromático e *aus*, indicando que, além da aparente diferenciação entre Indica e Japônica, outros grupos têm evoluído, mas ainda não foram claramente identificados e reconhecidos.

Variedades tradicionais de arroz são mantidas tanto pela capacidade de adaptação ao ambiente quanto pela seleção feita por produtores que determinam quais variedades são cultivadas a cada ano, diferentemente das populações selvagens de arroz, que se disseminam conforme a habilidade de sobreviver e competir sob condições naturais. Populações naturais tendem a ser mais estáveis do que cultivares em suas distribuições geográficas porque as forças da seleção natural geralmente levam a mudanças graduais no decorrer do tempo (THOMSON et al., 2009). Vários estudos feitos em populações de arroz selvagem na China têm caracterizado a diversidade local de *Oryza rufipogon* e encontrado vários graus de diferenciação dentro e entre populações locais (SONG et al., 2003; XU et al., 2006; ZHOU et al., 2003). Enquanto as relações entre as primeiras variedades domesticadas e variedades nativas presentes em regiões de cultivo atuais é ainda obscura, sinais de ancestralidade compartilhada, seleção e introgressão estão escritas nos genomas de variedades tradicionais. Ao longo de muitas gerações, o arroz se tornou um componente essencial de culturas e hábitos locais na Ásia, onde tem sido cultivado por milhares de anos. Ainda há muito que se diagnosticar sobre o impacto de práticas de produtores na preservação, troca e evolução de variedades tradicionais, mas esse conhecimento proverá uma base para a tomada de decisões sobre a conservação e uso de germoplasma tradicional em programas de melhoramento (THOMSON et al., 2009).

As variedades tradicionais mantidas em bancos de germoplasma abrangem um importante reservatório da diversidade genética e fontes de alelos de interesse para o melhoramento de arroz. Devido à importância do arroz como uma das principais plantas cultivadas mundialmente, estudos de origem e diversidade da espécie têm atraído grande interesse (THOMSON et al., 2007; LI et al., 2010). A diversidade e estrutura genética de coleções nucleares de arroz têm sido estudadas (BORBA et al., 2009b; LI et al., 2010) bem como a diversidade genética de germoplasma de arroz cultivado em uma escala global tem sido bem caracterizada usando marcadores moleculares (GARRIS et al., 2005; YU et al., 2003; CAICEDO et al., 2007, ALI et al., 2011), e para abranger a amplitude da diversidade, variedades de arroz de diferentes países produtores são amostradas para esses estudos. Enquanto fornecem uma visão geral da estrutura populacional do arroz cultivado, os

estudos globais não fornecem uma visão profunda do germoplasma em uma escala local, visto que cada região produtora é representada por um pequeno número de variedades (THOMSON et al., 2009). Estudos têm iniciado a caracterização de subgrupos de germoplasma de arroz em escala local, com marcadores moleculares sendo usados para descrever a diversidade genética de variedades tradicionais oriundas de regiões ou países específicos (JAIN et al., 2004; LU et al., 2005; PESSOA-FILHO et al., 2007; THOMSON et al., 2007; BORBA et al., 2009a).

O Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP recebeu germoplasma de outras instituições de pesquisa do Brasil e do exterior, incluindo acessos do Instituto de arroz de sequeiro do Japão, atualmente extinto (informação pessoal, Dr. Akihiko Ando). A diversidade genética de variedades tradicionais japonesas parece ser menor do que aquela da coleção mundial de germoplasma (KOJIMA et al., 2005), entretanto, há a expectativa de que cultivares adaptadas a certos locais tenham diferentes polimorfismos para a adaptação a diferentes condições ambientais (EBANA et al., 2008). O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade e estruturação genética dos acessos japoneses do banco de germoplasma de arroz da ESALQ utilizando marcadores SSRs e EST-SSRs.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal

Foram estudados 192 acessos japoneses de arroz pertencentes ao Banco de germoplasma de arroz cultivado do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Foram incluídas no estudo 11 variedades internacionais como controle para a análise da diversidade genética e estrutura populacional. Estas foram selecionadas de estudos prévios de Garriss et al. (2005) e Thomson et al. (2007), onde foram alocadas em grupos populacionais conhecidos, sendo três Japônica temperado (Nipponbare, Koshihikari e Caloro), três Japônica tropical (Moroberekan, IAC 25 e Canela de Ferro), quatro Indica (De Abril, IR 8, IR 36, IRGA 409) e uma aromática (Bico Branco).

3.2.2 Extração de DNA e Genotipagem com marcadores SSR

Sementes dos 203 genótipos foram semeadas em vasos e as plântulas conduzidas em casa de vegetação. Vinte dias após a germinação foram coletadas amostras do tecido foliar de uma planta por acesso para a extração de DNA genômico. As extrações de DNA foram realizadas utilizando o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). A concentração das amostras de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1% por comparação com o DNA-padrão do fago lambda, de peso molecular conhecido e cada amostra foi então diluída para a concentração de 10 ng/μl. A seleção dos marcadores microsatélites foi realizada baseada no *Polymorphism Information Content* (PIC) de cada loco, resolução de amplificação e distribuição considerando-se os doze cromossomos do arroz. Foram utilizados 24 locos previamente publicados (PANAUD et al., 1996; CHEN et al., 1997; TEMNYKH et al., 2000), sendo 12 marcadores moleculares anônimos (SSRs genômicos) (Tabela 3.1) e 12 EST-SSRs (Tabela 3.2).

Tabela 3.1 - Marcadores SSRs genômicos utilizados na identificação da diversidade genética em 192 acessos japoneses de arroz e 11 genótipos utilizados como padrões na análise de diversidade

Marcador	Cr	Forward primer	Reverse primer	PIC*
RM9	1	GGTGCCATTGTCTG TCCTC	ACGGCCCTCATCACCTTC	0,80
RM207	2	CCATTCGTGAGAAGATCTGA	CACCTCATCCTCGTAACGCC	0,86
RM55	3	CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG	TCCCGGTTATTTTAAGGCG	0,89
RM335	4	GTACACACCCACATCGAGAAG	GCTCTATGCGAGTATCCATGG	0,90
RM334	5	GTTCAAGTGTTCAGTGCCACC	GACTTTGATCTTTGGTGGACG	0,86
RM204	6	GTGACTGACTTGGTCTAGGG	GCTAGCCATGCTCTCGTACC	0,87
RM11	7	TCTCCTCTTCCCCC GATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG	0,78
RM38	8	ACGAGCTCTCGATCAGCCTA	TCGGTCTCCATGTCCCAC	0,86
RM257	9	CAGTTCCGAGCAAGAGTACTC	GGATCGGACGTGGCATATG	0,90
RM304	10	TCAAACCGGCACATATAAGAC	GATAGGGAGCTGAAGGAGATG	0,84
RM229	11	CACTCACACGAACGACTGAC	CGCAGGTTCTTGTGAAATGT	0,83
RM247	12	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTTGACAAAGCG	0,83

*valores de PIC descritos pelos autores que desenvolveram os marcadores

Tabela 3.2 - Marcadores EST-SSRs utilizados na identificação da diversidade genética em 192 acessos japoneses de arroz e 11 genótipos utilizados como padrões na análise de diversidade

Marcador	Cr	Gene	Forward primer	Reverse primer	PIC*
RM165	1	Sucrose-phosphate synthase	CCGAACGCCTAGAAGCGCGTCC	CGGCGAGGTTTGCTAATGGCGG	0,59
RM145	2	Aspartate aminotransferase	CCGGTAGGCGCCCTGCAGTTTC	CAAGGACCCCATCCTCGGCGTC	0,65
RM 143	3	bZIP protein	GTCCCGAACCCTAGCCCGAGGG	AGAGGCCCTCCACATGGCGACC	0,6
RM131	4	D40427	TCCTCCCTCCCTTCGCCCACTG	CGATGTTCCGCATGGCTGCTCC	0,7
RM146	5	Beta glucanase	CTATTATTCCCTAACCCCCATACCCTCC	AGAGCCACTGCCTGCAAGGCC	0,46
RM190	6	Starch synthase; waxy gene	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	TTGCAGATGTTCTTCCTGATG	0,80
RM180	7	13-kDa prolamin	CTACATCGGCTTAGGTGTAGCAACACG	ACTTGCTCTACTTGTGGTGAGGGACTG	0,63
RM149	8	Heat-shock protein 82	GCTGACCAACGAACCTAGGCCG	GTTGGAAGCCTTTCCTCGTAACACG	0,73
RM160	9	D40093	AGCTAGCAGCTATAGCTTGCTGGAGATC	TCTCATCGCCATGCGAGGCCTC	0,66
RM184	10	Glycine-rich cell wall protein	ATCCCATTCGCCAAAACCGGCC	TGACACTTGAGAGCGGTGTGG	0,66
RM181	11	w-3 fatty acid desaturase	ACGGGAGCTTCTCCGACAGCGC	TATGCTTTTGCCGTGTGCCGCG	0,47
		Ribulose biphosphate			
RM155	12	carboxylase	GAGATGGCCCCCTCCGTGATGG	TGCCCTCAATCGGCCACACCTC	0,52

*valores de PIC descritos pelos autores que desenvolveram os marcadores

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 15 µl contendo tampão 10X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 µM dos *primers forward* e *reverse*, 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase, e 10 ng de DNA molde. As reações foram conduzidas em termociclador com a seguinte programação: um pré-ciclo de 96°C por 5 minutos; seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C a 67°C conforme a temperatura de anelamento do *primer* selecionado por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; e um passo final de 72°C por 7 minutos. A checagem da amplificação foi feita por eletroforese horizontal em gel de agarose 2% e a detecção de polimorfismo alélico foi efetuada em géis desnaturantes de poliacrilamida a 6%, contendo 7M de uréia e tampão TBE 1X. Os produtos amplificados foram visualizados através de coloração do gel com nitrato de prata e o tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado comparando-se sua posição no gel em relação à posição das bandas de tamanho definido de um marcador padrão de peso molecular de 10 pb.

3.2.3 Análise de dados

Estimativas de diversidade genética como: número de alelos por loco, frequência dos alelos, diversidade gênica e PIC foram determinadas usando o programa PowerMarker (LIU; MUSE, 2005). As frequências alélicas obtidas no PowerMarker foram utilizadas para o cálculo da matriz de distância genética de Rogers modificada por Wright (1978) (Rogers-W) no programa NTSYSpc (ROHLF, 2000), seguida de construção de dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA. O dendrograma foi desenhado utilizando o programa DARwin (PERRIER ; JACQUEMOUD-COLLET, 2006) e a estabilidade dos agrupamentos foi testada através de 10.000 reamostragens *bootstrap*.

A matriz de Rogers-W obtida no NTSYS foi transformada para matriz identidade calculada pelo complemento da distância genética de Rogers-W (1 – distância) entre pares de acessos. A matriz identidade foi usada para a análise de coordenadas principais (PCoA) com os subprogramas DCENTER, EIGEN, e MXPLOT do programa

NTSYS-pc (ROHLF, 2000). Representações gráficas das coordenadas principais mostradas nas Figuras 3.4 e 3.8 foram obtidas com o software STATISTICA (STATSOFT, 2011).

A análise de estrutura populacional entre os acessos foi feita usando o programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), com *burn-in* de 100.000 seguido por 200.000 iterações, e no modelo *no admixture* com frequências alélicas independentes. Foram testados valores de k de 1 a 10, com cinco simulações independentes para cada agrupamento. A determinação do número K mais provável em relação aos propostos foi realizada utilizando o método de Evanno, Regnaut e Goudet (2005) implementado no aplicativo STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2011). Para os grupos identificados pela análise de estrutura populacional, a distância de Nei (NEI; TAJIMA; TATENO, 1983) foi calculada no programa PowerMarker (LIU; MUSE, 2005).

3.3 Resultados

3.3.1 Diversidade detectada pelos marcadores SSRs

Diversidade detectada pelos marcadores SSRs nos acessos e padrões

Um total de 196 alelos foi detectado com os 24 marcadores SSRs nos 203 genótipos estudados. O número de alelos por loco variou de 2 (RM 184) a 16 (RM 257 e RM 335), com uma média de 8,17 alelos por loco (Tabela 3.3). Os valores de PIC variaram de 0,11 (RM 143) a 0,82 (RM 304), com uma média geral de 0,46, sendo que a média para os SSRs genômicos foi de 0,59 e para os EST-SSRs foi de 0,33. Os valores de diversidade gênica variaram de 0,11 (RM 143) a 0,84 (RM304), com média geral de 0,49, sendo médias de 0,62 e 0,36 para SSRs genômicos e EST-SSRs, respectivamente. A frequência do alelo mais comum para cada loco variou de 29% (RM 304) a 94% (RM 143 e RM 131). Em média, 65% dos genótipos compartilharam o alelo mais frequente no loco.

Um total de 15 alelos foi encontrado somente no grupo de padrões acrescentados no estudo, para os marcadores RM 207, RM229, RM247, RM335, RM304 (2 alelos), RM334, RM 11 (2 alelos), RM190, RM143 (2 alelos), RM145 e RM146 (2 alelos).

Diversidade detectada pelos marcadores SSRs nos acessos japoneses

Considerando-se apenas os 192 acessos de origem japonesa, um total de 181 alelos foi detectado pelos 24 marcadores SSRs (Figuras 3.1 e 3.2). O número de alelos por loco variou de 2 (RM 184, RM 143 e RM 146) a 16 (RM 257), com média de 7,54 (Tabela 3.3). Os valores de PIC variaram de 0,01 (RM 143) a 0,80 (RM 304), com média geral de 0,43 e médias de 0,56 e de 0,30 para os SSRs genômicos e EST-SSRs, respectivamente. Os valores de diversidade gênica variaram de 0,01 (RM 143) a 0,82 (RM304), com média geral de 0,46, sendo médias de 0,59 para os SSRs genômicos e 0,33 para os EST-SSRs.

A frequência do alelo mais comum para cada loco variou de 30% (RM 304) a 99% (RM 143). Em média, 67% dos 192 acessos japoneses de arroz compartilharam o alelo mais frequente no loco. Em oito dos doze SSRs genômicos utilizados, a frequência do alelo mais comum ultrapassou os 50% (RM 257, RM 207, RM 229, RM 38, RM 334, RM 9, RM 55, RM 11), sendo que em quatro ultrapassou os 70% (RM 229, RM 334, RM 55 e RM 11), indicando que a maioria dos acessos possui o mesmo alelo, para a maioria dos locos utilizados. Dos doze EST-SSRs utilizados, em nove a frequência de acessos portando o mesmo alelo ultrapassou os 70%, sendo que em sete deles ultrapassou os 85%.

Figura 3.1 - Frequências alélicas para marcadores SSRs genômicos utilizados no estudo de diversidade genética entre 192 acessos japoneses de arroz. O eixo y indica a frequência do alelo (%) e o eixo x o tamanho do alelo (pb)

Figura 3.2 - Frequências alélicas para os marcadores EST-SSRs utilizados no estudo da diversidade genética entre 192 acessos japoneses de arroz. O eixo y indica a frequência do alelo (%) e o eixo x o tamanho do alelo (pb)

Tabela 3.3 - Estatísticas de diversidade genética para 24 marcadores SSRs utilizados na análise dos 203 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e 11 variedades internacionais (padrões))

Marcador	Cr	Motivo	Acessos e padrões					Acessos				
			Nº de alelos	Alelo mais frequente		PIC	D	Nº de alelos	Alelo mais frequente		PIC	D
				Tamanho	Frequência				Tamanho	Frequência		
RM207	2	(CT) ₂₅	13	118	0,56	0,64	0,66	12	118	0,59	0,61	0,63
RM257	9	(CT) ₂₄	16	162	0,60	0,60	0,62	16	162	0,64	0,56	0,58
RM229	11	(TC) ₁₁ (CT) ₅ C ₃ (CT) ₅	9	132	0,71	0,45	0,47	8	132	0,75	0,39	0,41
RM247	12	(CT) ₁₆	12	168	0,46	0,66	0,70	11	168	0,46	0,64	0,69
RM38	8	(CT) ₁₆	8	336	0,53	0,65	0,68	8	336	0,56	0,62	0,65
RM335	4	(CTT) ₂₅	16	158	0,41	0,72	0,75	15	158	0,43	0,70	0,73
RM304	10	(GT) ₂ (AT) ₁₀ (GT) ₃₃	15	146	0,29	0,82	0,84	13	146	0,30	0,80	0,82
RM334	5	(CTT) ₂₀	10	170	0,75	0,42	0,43	9	170	0,77	0,39	0,40
RM9	1	(GA) ₁₅ GT(GA) ₂	15	152	0,52	0,69	0,70	15	152	0,53	0,67	0,69
RM55	3	(GA) ₁₇	5	260	0,73	0,39	0,43	5	260	0,75	0,36	0,40
RM204	6	(CT) ₄₄	10	154	0,48	0,64	0,69	10	154	0,48	0,63	0,68
RM11	7	(GA) ₁₇	6	106	0,71	0,42	0,46	4	106	0,75	0,37	0,41
Média SSRs			11,25		0,56	0,59	0,62	10,50		0,59	0,56	0,59
RM190	6	(CT) ₁₁	8	120	0,44	0,58	0,64	7	120	0,46	0,56	0,63
RM180	7	(ATT) ₁₀	6	130	0,89	0,21	0,21	6	130	0,89	0,20	0,20
RM146	5	(CT) ₁₁ -(CT) ₇	4	345	0,75	0,33	0,38	2	345	0,77	0,29	0,35
RM149	8	(AT) ₁₀	8	300	0,32	0,73	0,77	8	300	0,34	0,72	0,76
RM184	10	(GAA) ₂₃	2	220	0,88	0,18	0,21	2	220	0,89	0,18	0,20
RM155	12	(CTT) ₇	6	320	0,69	0,45	0,48	6	320	0,72	0,41	0,44
RM165	1	(CT) ₁₃	3	160	0,87	0,22	0,24	3	160	0,89	0,18	0,20
RM145	2	(GA) ₃₁	7	224	0,49	0,49	0,58	6	224	0,49	0,47	0,56
RM143	3	(CGG) ₇	4	220	0,94	0,11	0,11	2	220	0,99	0,01	0,01
RM181	11	(CT) ₁₃ (AT) ₁₉	5	250	0,87	0,22	0,23	5	250	0,86	0,23	0,25
RM131	4	(CT) ₉	3	196	0,94	0,12	0,12	3	196	0,96	0,08	0,08
RM160	9	(GAA) ₂₃	5	130	0,81	0,31	0,33	5	130	0,86	0,24	0,26
Média EST-SSRs			5,08		0,74	0,33	0,36	4,58		0,76	0,30	0,33
Média			8,17		0,65	0,46	0,49	7,54		0,67	0,43	0,46

Alelos exclusivos

Nos 192 acessos analisados foram encontrados 38 alelos exclusivos distribuídos em 26 (13,54%) acessos (Tabela 3.4). Esses alelos exclusivos foram encontrados em 16 dos 24 marcadores utilizados. Destes, dez são marcadores SSRs genômicos e seis são marcadores SSRs localizados em sequências expressas do genoma do arroz.

Tabela 3.4 - Alelos exclusivos detectados entre os 192 acessos japoneses de arroz

Marcador	Alelos	Acessos
RM 207	120; 132; 140 e 152	173J - Nourin 11; 139J - Nourin Mochi 1; 413J - Chousen e 113J – Kyuushuu
RM 257	122; 134 e 148	413J - Chousen; 289J - Shinhoku Daiou Mochi e 113J - Kyuushuu
RM 229	124; 126 e 136	413J - Chousen; 113J - Kyuushuu e 191J - Col/Fukui/1965
RM 247	142; 150; 152 e 162	413J - Chousen; 136J - Yamato Nishiki; 78J - Yonoyuki Mochi e 219J - Gaisen
RM 38	296	290J - Riku Araki
RM 335	118; 122; 146; 152; 164; 174 e 182	139J - Nourin Mochi 1; 70J - Kirishima; 170J - Tanaka Yakan; 113J - Kyuushuu; 209J - Kangyouho; 36J - Nakaahara Mochi e 150J - Atoshirazu
RM 304	148; 174; 178 e 182	311J - Hiderishirazu 1; 393J - Gaisen Mochi 1; 12.7J e 257J - Hiderishirazu 2
RM 9	150	191J - Col/Fukui/1965
RM 55	244	413J – Chousen
RM 204	146 e 176	110J - Mikuni No Homare e 273J - Shina Mochi
RM 155*	302 e 316	70J - Kirishima e 389J - Igisu Mochi
RM 180*	182 e 248	413J - Chousen e 239J - Col/Miyazaki/1963
RM 149*	205	172J – Oohataho
RM 143*	210	113J – Kyuushuu
RM 181*	262	139J - Nourin Mochi 1
RM 160*	134	99J - Eika Ine

* indica primers SSRs localizados em regiões expressas.

Os marcadores SSRs genômicos identificaram maior número de alelos exclusivos, 30 (78,94%) dos 38 encontrados. O *primer* RM 335 destaca-se por ter

detectado o maior número de alelos exclusivos entre todos os utilizados, identificando sete alelos, que correspondem a 18,42% de todos os alelos exclusivos detectados. Dois acessos (70J - Kirishima e 191J - Col/Fukui/1965) apresentaram alelos exclusivos para dois locos, sendo que para o acesso 191J, os dois alelos exclusivos foram para locos genômicos RM 229 e RM 9, enquanto para o acesso 70J um alelo foi exclusivo para um loco genômico (RM 335) e o outro alelo foi exclusivo para um EST-SSR (RM 155). O acesso 139J - Nourin Mochi 1 é portador de três alelos exclusivos, para os locos genômicos RM 207 e RM 335, e para o expresso RM 181. O acesso 113J – Kyuushuu é portador de cinco alelos exclusivos para cinco locos, sendo quatro genômicos e um expresso (RM 143) enquanto que o acesso 413J - Chousen destaca-se por apresentar o maior número de alelos exclusivos entre os 192 acessos, com alelos exclusivos para seis locos.

3.3.2 Análises de agrupamento e estrutura populacional

Análises de agrupamento e estrutura populacional considerando apenas os padrões utilizados no estudo

Análises de agrupamento e de estrutura populacional foram feitas previamente somente para os genótipos incluídos como padrões no estudo para identificar se os marcadores utilizados permitiam a identificação correta dos grupos aos quais os padrões já haviam sido alocados em outros estudos (GARRIS et al., 2005; THOMSON et al., 2007, 2009). Os marcadores utilizados permitiram a identificação das variedades pertencentes aos grupos Indica, Japônica temperado e Japônica tropical através de análises baseadas em distância genética (Figura 3.3), identidade genética (Figura 3.4), e análise de estrutura populacional utilizando o programa STRUCTURE (Figuras 3.5 e 3.6).

A análise de agrupamento utilizando o método UPGMA permitiu a separação das subespécies Indica e Japônica, e a separação de Japônica nos grupos tropical e temperado (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Dendrograma de 11 variedades internacionais de arroz, obtido pelo método de agrupamento UPGMA usando a distância de Rogers-W e baseado em 24 marcadores SSRs

De forma similar ao agrupamento UPGMA, a análise de coordenadas principais baseada em identidade genética permitiu a separação dos grupos Indica, Japônica tropical e Japônica temperado (Figura 3.4). O padrão aromático Bico Branco localizou-se entre os demais grupos, sendo a proximidade maior para o grupo Japônica tropical.

Figura 3.4 - Análise de coordenadas principais de 11 variedades internacionais de arroz feita com base no complemento da distância de Rogers-W

Na análise de estrutura populacional utilizando a simulação do programa STRUCTURE para os 11 padrões, os valores de $\text{LnP}(D)$ de Pritchard, Stephens e Donnelly (2000) e de ΔK de Evanno, Regnaut e Goudet (2005) apresentaram um pico para $K = 2$ (Figura 3.5), permitindo reconhecer inicialmente as subespécies Indica e Japônica (Figura 3.6a). O segundo valor de ΔK foi para $k = 3$ (Figura 3.5), o que por sua vez permitiu reconhecer os três grupos: Indica, Japônica temperado e Japônica tropical (Figura 3.6b). A cultivar Bico Branco agrupou juntamente com as cultivares do grupo Japônica tropical.

Figura 3.5 - Média dos valores de: a) $\ln P(D)$ de Pritchard et al. (2000) e b) ΔK de Evanno et al. (2005) para cinco repetições de simulações no programa Structure com $k = 1$ a 10 para 11 variedades de arroz

Figura 3.6 - Alocação de 11 variedades de arroz em dois grupos (Indica e Japonica) e três grupos (Japonica temperado, Japonica tropical e Indica) identificados na análise da estrutura populacional

Análises de agrupamento e estrutura populacional considerando os 192 acessos japoneses e os padrões utilizados no estudo

Análises baseadas em distância e agrupamento

Os resultados das análises baseadas na distância genética de Rogers-W e agrupamento UPGMA de 192 acessos japoneses e 11 variedades de arroz permitiram identificar primeiramente dois grupos. Esses dois grupos são referentes às subespécies Indica e Japônica (Figura 3.7). Enquanto três acessos (139J - Nourin Mochi 1, 413J - Chousen e 113J - Kyuushuu) agruparam juntamente com as variedades utilizadas como controle da subespécie Indica, os demais 189 acessos, 98,4% dos acessos japoneses, agruparam juntamente com os padrões do grupo Japônica. A cultivar Bico Branco, utilizada como padrão do grupo aromático, agrupou juntamente com os padrões do grupo Japônica tropical dentro do grupo maior constituído por acessos japoneses e padrões Japônica. A análise de estrutura populacional do programa STRUCTURE, cujos resultados serão apresentados mais adiante, apresentou resultados consistentes com a análise de agrupamento baseado na distância genética e permitiu a identificação de subgrupos dentro do grupo formado por acessos japoneses e padrões da subespécie Japônica (barras situadas à direita na Figura 3.7).

Figura 3.7 - Dendrograma de 203 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e 11 padrões), construído pela distância de Rogers-W e pelo critério de agrupamento UPGMA. Os 11 padrões são identificados pelas ramificações nas cores vermelha (Indica), amarelo (Japônica tropical), verde (Aromático) e azul (Japônica temperado). As três barras alocadas à direita no dendrograma correspondem aos agrupamentos identificados pela análise de estrutura populacional para os valores de $k=2$, $k=4$ e $k=8$

Análise de coordenadas principais

De maneira similar à análise de agrupamento UPGMA, a análise de coordenadas principais baseada no complemento da distância de Rogers-W permitiu a identificação de um agrupamento das quatro variedades Indica com três acessos japoneses e das variedades Japônica e aromático com os demais acessos japoneses (Figura 3.8). Este grande grupo identificado como Japônica pode ser separado em dois grupos, um grupo formado por alguns acessos e os padrões pertencentes à subespécie Japônica, e o outro grupo formado exclusivamente por acessos japoneses.

Figura 3.8 - Análise de coordenadas principais de 203 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e 11 variedades internacionais) feita com base no complemento da distância de Rogers-W

Análise da estrutura populacional

Na análise de estrutura populacional utilizando a simulação do programa STRUCTURE para os 203 genótipos de arroz, o valor de $\text{LnP}(D)$ aumentou juntamente com o aumento do K de 1 até 5, e evidenciou-se picos para $k = 2$ e $k = 8$ (Figura 3.9a). Isso implica na existência inicial de dois grupos de similaridade, que são subdivididos em outros grupos. Também foi observado um pico no valor de ΔK para $k = 2$, com um pico menor para $k=8$ (Figura 3.9b).

Figura 3.9 - Média dos valores de: a) $\text{LnP}(D)$ de Pritchard et al. (2000) e b) ΔK de Evanno et al. (2005) para cinco repetições de simulações no programa Structure com $k = 1$ a 10 para 192 acessos japoneses e 11 variedades de arroz

O menor valor de k que permitiu o agrupamento de padrões em seus respectivos grupos foi para $k = 4$ (Figura 3.10b). Para $k = 8$, que apresentou o segundo maior valor para ΔK , os padrões foram separados de acordo com o seu grupo anteriormente conhecido (Figura 3.10c). Para valores de k de 1 a 3, os grupos dos padrões não foram identificados.

Para o valor de $K = 2$ (Figura 3.10a), 128 acessos pertenceram exclusivamente a um grupo enquanto que 25 acessos e os 11 padrões foram agrupados em outro grupo. Os 36 acessos restantes apresentaram probabilidade de pertencer aos dois grupos.

Para o valor de $k = 4$, três acessos foram alocados juntamente com as testemunhas da subespécie *Indica*, enquanto que 26 acessos foram alocados com

os padrões Japônica tropical e o padrão aromático Bico Branco. Um total de 62 acessos apresentou alguma probabilidade de pertencer a esse agrupamento com os padrões Japônica tropical, sendo que 30 deles apresentaram mais de 75% de probabilidade de pertencer a esse agrupamento. O maior grupo identificado foi composto exclusivamente por 101 acessos japoneses, e 53 acessos apresentaram alguma probabilidade de pertencer a esse grupo, sendo que 25 acessos apresentaram mais de 75% de probabilidade de pertencer a esse grupo. O menor grupo foi formado pelos padrões Japônica temperado e por três acessos que apresentaram mais de 80% de probabilidade de pertencer ao mesmo grupo que estes padrões.

Para $k = 8$ (Figura 3.10c), as variedades Indica formaram um agrupamento sem a presença de acessos japoneses. A exemplo dos padrões Indica, as variedades Japônica temperado também não foram agrupadas com acessos, mas alguns acessos apresentaram uma pequena probabilidade de agrupamento com estes padrões. As variedades padrão Japônica tropical e Bico Branco (padrão do aromático) agruparam juntamente com 45 acessos japoneses (Grupo VIII).

A maior parte dos acessos japoneses foi dividida em três grandes grupos, constituídos por 99 acessos (Grupo II), 45 acessos (Grupo VIII, agrupados com os três padrões Japônica tropical e um aromático), e 42 acessos (Grupo IV). Os seis acessos japoneses restantes foram divididos em mais três grupos; os três acessos que agruparam com o Japônica temperado para $k = 4$ formaram um agrupamento isolado para $k = 8$ (Grupo III na Figura 3.10c) e os três acessos (Grupo VI e VII) que anteriormente estavam agrupados com os padrões Indica apresentaram mistura de quatro grupos para $k = 8$, uma porção (coloração laranja) exclusiva para esses três acessos, uma porção com Indica (vermelha), e as outras duas (verde claro e amarela) com Japônica temperado.

Figura 3.10 - Alocação de 203 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e 11 variedades utilizadas como padrões) em grupos identificados na análise da estrutura populacional usando o programa Structure para: a) k=2, b) k=4 e c) k=8

Estimativas de diversidade genética para os grupos nos quais os acessos foram divididos pela análise de estrutura populacional são apresentadas na Tabela 3.5. Os maiores valores de número de alelos por loco, PIC e diversidade gênica foram observados para o grupo VIII, constituído por 45 acessos japoneses e quatro padrões (três Japônica tropical e um aromático), enquanto que os menores valores foram observados para o grupo V formado apenas pelos três padrões Japônica

temperado. O grupo II, constituído pelo maior número de acessos apresentou diversidade gênica inferior aos grupos IV, VI e VII, VIII.

Tabela 3.5 – Estimativas de diversidade para cada grupo identificado na análise de estrutura populacional de 192 acessos japoneses e 11 variedades de arroz

Grupo	Nº de genótipos	Freq. do alelo mais comum	Número de alelos/loco	Diversidade gênica	PIC
I (Indica)	4	0,760	1,79	0,30	0,24
II	99	0,785	4,46	0,30	0,28
III	3	0,861	1,38	0,17	0,13
IV	42	0,719	3,92	0,38	0,35
V (Jap. temp.)	3	0,854	1,38	0,16	0,13
VI e VII*	3	0,681	1,96	0,38	0,31
VIII (Jap. Trop. e acessos)	49	0,587	5,08	0,52	0,47

*Acessos constituídos pela mistura de mais de um grupo foram considerados como um grupo.

A distância genética de Nei (1983) foi estimada entre os grupos, e os três grupos que abrangeram a maior parte dos acessos (grupos II, IV e VIII) apresentaram as menores distâncias entre grupos (Tabela 3.6), enquanto que a maior distância foi observada entre o grupo I, dos padrões Indica com os grupos III e V.

Tabela 3.6 - Distância genética de Nei (1983) baseada em 24 marcadores SSRs entre os grupos identificados pelo programa Structure

Grupo	I	II	III	IV	V	VI e VII	VIII
I (Indica)	0,000	0,771	0,860	0,792	0,855	0,604	0,713
II		0,000	0,484	0,117	0,572	0,726	0,170
III			0,000	0,475	0,728	0,760	0,461
IV				0,000	0,623	0,779	0,238
V (Jap. temp.)					0,000	0,815	0,570
VI e VII*						0,000	0,653
VIII (Jap. trop. e acessos)							0,000

*Acessos constituídos pela mistura de mais de um grupo foram considerados como um grupo

Os grupos II e IV para $k = 8$ (Figura 3.10c), que apresentaram a menor distância entre grupos foram reunidos em um mesmo grupo quando foi considerado um $k = 4$.

3.4 Discussão

Os 192 acessos japoneses de arroz apresentaram valores de diversidade gênica (em média 0,46), PIC (0,43) e número de alelos por loco (7,54) (Tabela 3.3) menores quando comparados com os observados em estudos conduzidos em escala global, em um grupo de 234 acessos de arroz de 34 países com 169 marcadores SSRs (diversidade gênica de 0,7, PIC de 0,67 e 11,8 alelos por loco) e em um grupo de 409 acessos de 79 países avaliados com 36 marcadores SSRs (diversidade gênica de 0,68, PIC 0,68 e 9,17 alelos por marcador), conduzidos por Garris et al. (2005) e Ali et al. (2011), respectivamente. Isso é consistente com a expectativa de que variedades amostradas em determinada região geográfica seriam menos diversas visto que são oriundas e cultivadas em grupos de ambientes similares, enquanto que o germoplasma oriundo de uma ampla gama de regiões diferentes geograficamente e ecologicamente irá conter maior diversidade genética devido a divergentes pressões de seleção. Uma explicação alternativa é que em estudos de escala global, há maior ênfase na inclusão de variedades divergentes nos subgrupos de germoplasma para representar um maior número de regiões, e as amostras são escolhidas para abranger toda a amplitude de diversidade genética de uma coleção maior de germoplasma (THOMSON et al., 2009).

Comparando com estudos conduzidos em escala local, a diversidade observada nos acessos japoneses também é menor do que a encontrada em um conjunto de 309 acessos, incluindo variedades melhoradas e tradicionais da Indonésia, avaliados com 30 marcadores SSRs e que apresentaram uma média de 11,9 alelos por loco, diversidade gênica de 0,68 e PIC de 0,64 (THOMSON et al., 2007). A variabilidade genética observada neste trabalho, representada pela média do número de alelos por loco e PIC também foi inferior à encontrada por Borba et al. (2009a) em 417 variedades tradicionais brasileiras, que avaliadas com 12 SSRs, apresentaram 16,7 alelos por loco, PIC de 0,55 e 41 alelos privados. Entretanto, nos dois estudos em escala local citados anteriormente, os marcadores utilizados foram marcadores genômicos, que são mais polimórficos e identificam maior diversidade genética do que marcadores SSRs localizados em regiões expressas (ELLIS; BURKE, 2007). Neste trabalho, metade dos marcadores utilizados foram EST-SSRs,

que embora sejam menos polimórficos que os genômicos, estão relacionados com características fenotípicas (PINTO et al., 2011). Considerando-se apenas as médias de diversidade e PIC observadas para os marcadores genômicos (diversidade gênica de 0,56, PIC de 0,59, e 10,5 alelos/loco), os níveis de diversidade encontrados permanecem inferiores aos níveis detectados em variedades da Indonésia por Thomson et al. (2007) e com valor de PIC equivalente ao observado nas variedades tradicionais brasileiras por Borba et al. (2009a), porém com menor número de alelos por loco.

Os acessos japoneses apresentaram uma diversidade maior quando comparado com a diversidade observada em 183 variedades tradicionais da província de East Kalimantan, Ilha de Borneo na Indonésia, estudadas com 30 marcadores SSR, que detectaram uma média de 5,0 alelos por loco, diversidade gênica de 0,49 e PIC de 0,44 (THOMSON et al., 2009).

Em todos os estudos citados anteriormente, as comparações são baseadas no total de acessos utilizados nos estudos, o que implica na ocorrência de acessos pertencentes aos cinco grupos: Indica, *aus*, aromático, Japônica temperado e Japônica tropical. E visto que, entre os acessos japoneses, a grande maioria é pertencente à subespécie Japônica, seria coerente comparar os níveis de diversidade apenas com os observados para a subespécie Japônica nesses estudos. Em estudos de germoplasma em escala global, 45 acessos Japônica temperado e 44 acessos Japônica tropical apresentaram respectivamente médias de 4,9 e 6,1 alelos por loco, diversidade gênica de 0,39 e 0,47, e PIC de 0,37 e 0,46 (GARRIS et al., 2005). Em estudo recente, num grupo maior de acessos, 108 Japônica temperado e 104 Japônica tropical, foram observadas médias de 4,53 e 4,33 alelos por loco e PIC de 0,29 e 0,30 para os grupos temperado e tropical, respectivamente, e para ambos os grupos, a diversidade gênica foi de 0,32 (ALI et al., 2011). Comparando-se com a diversidade observada na subespécie Japônica em escala global, os acessos japoneses do banco de germoplasma da ESALQ apresentam maior diversidade genética. Isto indica que embora grande parte da diversidade seja amostrada para estudos globais, toda a variabilidade existente em grupos específicos ainda não é completamente amostrada e reforça a importância do estudo de germoplasma em escala local.

Os níveis de diversidade observados na coleção de acessos japoneses mantida no Banco de Germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ podem ser considerados equivalentes aos mantidos na coleção mantida no banco de germoplasma do *National Institute of Agrobiological Sciences* - NIAS no Japão. Ebana et al. (2008) estudando 236 variedades tradicionais japonesas da coleção mantida no banco de germoplasma do NIAS com 32 marcadores SSRs, detectaram um total de 247 alelos, com média de 7,7 alelos por loco. A diversidade de variedades tradicionais japonesas parece ser menor do que aquela da coleção mundial de germoplasma. Uma pequena coleção nuclear de uma coleção mundial, a *Rice Diversity Research Set* do NIAS foi obtida, e apenas dois acessos japoneses foram incluídos nesse grupo (KOJIMA et al., 2005). Entretanto, há a expectativa de que cultivares adaptadas a certos locais tenham diferentes polimorfismos para a adaptação a diferentes condições ambientais. O grupo de variedades tradicionais japonesas é exclusivo e importante para o entendimento da adaptação do arroz para as regiões ao norte (EBANA et al., 2008).

Os resultados das análises baseadas na distância genética (Figura 3.7) e similaridade (Figura 3.8) para os acessos japoneses e os padrões internacionais revelaram a clara divisão das subespécies Indica e Japônica, sendo que apenas três (1,56%) dos 192 acessos japoneses estudados apresentam maior similaridade com a subespécie Indica do que com a subespécie Japônica. Embora tanto variedades do tipo Japônica quanto do tipo Indica tenham sido cultivadas no passado, atualmente apenas o tipo Japônica é cultivado no Japão de onde os acessos são oriundos. Pensa-se que o primeiro tipo de arroz introduzido no Japão tenha sido o Japônica baseado em impressões de sementes em cerâmica. Entretanto, pinturas em cerâmica de datas mais antigas tem formas de grãos longos e pesquisadores acreditam que sejam representações da subespécie Indica. É provável que os primeiros cultivos de arroz consistissem de populações heterogêneas que podem ter incluído tanto a subespécie Indica como a Japônica (NAKAGAHARA et al., 1997). Isso elucidaria o fato de que os acessos 113J (Kyuushuu), 413J (Chousen) e 139J (Nourin Mochi 1) foram mais parecidos com os padrões Indica do que com os Japônica nos três tipos de análise realizadas. Em estudo com acessos da coleção mantida no banco de germoplasma do NIAS, Ebana et al. (2008) também

detectaram a presença de acessos pertencentes à subespécie Indica (quatro acessos Indica em 236 estudados), em proporção parecida com a observada nos acessos japoneses do banco de germoplasma da ESALQ (três acessos Indica em 192 acessos estudados).

A identificação de genótipos pertencentes à subespécie Indica ou Japônica em estudos de diversidade genética utilizando marcadores SSRs vem sendo bastante relatada em estudos de acessos de germoplasma (GARRIS et al., 2005; THOMSON et al., 2007, 2009; ZHANG et al., 2009). Neste estudo, as análises baseadas em distância e similaridade genética permitiram a identificação das duas subespécies pela inclusão de padrões na análise. No entanto, não permitiram uma identificação detalhada dentro da subespécie Japônica. Quando os padrões foram analisados separadamente, a divisão dentro da subespécie Japônica foi clara (Figuras 3.3, 3.4 e 3.6b)

Mais de 98% dos acessos pertenceram à subespécie Japônica, o que reflete o fato de que esses acessos são de origem de sequeiro. Estudos têm relatado que é rara a ocorrência de exemplares da subespécie Indica em condições de sequeiro. Thomson et al. (2009) estudando 183 acessos coletados em Kalimantan, Indonésia, identificaram que, entre acessos coletados em condições de sequeiro, 98% eram pertencentes à subespécie Japônica. Em comparação, em estudo com 548 variedades tradicionais de sequeiro do Brasil, que se pensava previamente consistir inteiramente de variedades Japônica tropical, foi encontrado um grupo de 63 acessos com *background* genético da subespécie Indica (PESSOA-FILHO et al., 2007). Uma proporção similar foi encontrada em Yunnan, China, onde 57 de 692 variedades tradicionais foram designadas como variedades Indica de sequeiro (ZHANG et al., 2007).

Enquanto as análises de agrupamento e de coordenadas principais permitiram detectar a diferença entre as subespécies Indica e Japônica, a análise de estrutura populacional utilizando o programa STRUCTURE, num primeiro momento não permitiu a separação em Indica e Japônica com um $k = 2$ (Figura 3.10a), diferentemente dos relatos de outros estudos em que a separação é clara quando dois grupos são considerados nas análises de estrutura populacional (THOMSON et al., 2009; ZHANG et al., 2009). Para um agrupamento de $k = 2$, os 11 padrões utilizados no estudo foram identificados num mesmo grupo, juntamente com 25

acessos japoneses. Outros 36 acessos apresentaram alguma probabilidade de pertencer a esse grupo. A proximidade genética entre acessos oriundos de um mesmo país ou região geográfica foi observada em outros estudos (ALI et al., 2011; GARRIS et al., 2005). Essa proximidade observada entre os acessos japoneses pode ter implicado no padrão de agrupamento, onde primeiramente os acessos foram identificados como mais próximos, formando esse grande grupo, e consequentemente os outros genótipos, incluindo o diverso grupo de padrões foi alocado como sendo um único grupo.

Com um número de grupos igual a quatro, os padrões foram corretamente identificados em grupos separados (Figura 3.10b). A subespécie Japônica foi dividida inicialmente em três grupos pela análise de estrutura populacional. A divisão dentro da subespécie Japônica é, no entanto, mais complexa do que somente a divisão entre os tipos Japônica tropical e Japônica temperado normalmente encontrados em estudos de diversidade em escala global como os de Garriss et al. (2005) e Ali et al. (2011). No estudo de Thomson et al. (2007) com variedades da Indonésia, os três padrões Japônica temperado agruparam dentro do grande grupo Japônica, tornando difícil estabelecer uma fronteira entre os grupos temperado e tropical. Alguns acessos japoneses no presente estudo agruparam com os padrões tropical e temperado, mas a grande maioria dos acessos formou um grupo constituído apenas por acessos japoneses (Figura 3.10b, grupo identificado como *Acessos*). Esse padrão de agrupamento pode ser explicado pela adaptação a condições agro-ecológicas. Por exemplo, apenas três acessos agruparam com os padrões do tipo *temperado*, que são variedades melhoradas adaptadas ao cultivo irrigado; Koshihikari e Nipponbare são cultivares amplamente conhecidas no Japão, e a maioria das cultivares melhoradas recentemente são originárias delas, especialmente de Koshihikari, enquanto que Caloro foi desenvolvida na Califórnia a partir de introduções de germoplasma oriundo da Ásia. Como os acessos japoneses estudados são originalmente de condições de sequeiro, na ocorrência de uma suposta separação por ambiente de cultivo, apenas poucos acessos puderam ser identificados com alguma similaridade genética para esses padrões, sendo mais similares a variedades do grupo Japônica tropical, mesmo que originárias de outros países – Canela de Ferro e IAC 25 são cultivares desenvolvidas no Brasil, enquanto

Moroberekan é uma cultivar desenvolvida em Guiné. Além disso, há relatos na literatura de que, em 1927, o melhoramento de arroz no Japão foi organizado por zonas ambientais para assegurar que variedades adaptadas para as diversas condições do Japão fossem desenvolvidas (NAKAGAHARA et al., 1997). Como esses acessos foram trazidos para o Brasil juntamente com a informação de que havia entre eles variedades melhoradas, acredita-se que alguns destes possam ter sido obtidos dentro desta estrutura de melhoramento iniciada no Japão em 1927. Adicionalmente, no estudo de Ebana et al. (2008) com variedades japonesas, um grupo identificado como Japônica pela análise de coordenadas principais foi dividido em dois subgrupos, que corresponderam a variedades dos sistemas de cultivo irrigado e de sequeiro. Enquanto um grupo foi uma mistura de variedades de sequeiro e irrigado, o outro grupo consistiu apenas de variedades de sequeiro.

A variedade Bico Branco, incluída no estudo como padrão para o grupo aromático agrupou com as variedades do grupo Japônica tropical pelas análises de agrupamento (Figuras 3.3 e 3.4) e de estrutura populacional (Figura 3.6b). Esse padrão de agrupamento também foi relatado por Thomson et al. (2007), em que a variedade JC1 incluída como controle do grupo aromático demonstrou proximidade com o grupo Japônica tropical. Tanto o genótipo Bico Branco como o JC1 foram utilizados no estudo de Garris et al. (2005) e ambos foram incluídos no grupo aromático, com pequenas porções pertencentes ao agrupamento Japônica tropical. Garris et al. (2005) também detectaram que o grupo aromático compartilha um ancestral materno recente com Japônica através da análise de diversidade cloroplastidial. Acessos aromáticos formaram um grupo separado, em estudo com um diverso grupo de acessos, sendo o grupo mais próximo do grupo Japônica tropical baseado em análises com marcadores SSRs, embora em análises baseadas no fenótipo o grupo aromático tenha sido mais próximo dos grupos *aus* e *Indica* (ALI et al., 2011).

Os quatro grupos iniciais nos quais a divisão de subespécie é reconhecida são subdivididos formando oito grupos (Figuras 3.9b e 3.10c). Vários estudos têm relatado a subdivisão em vários grupos dentro da subespécie Japônica em estudos de escala local (THOMSON et al., 2009; ZHANG et al., 2007). A análise da distância entre os oito grupos (Tabela 3.6), permitiu a identificação de padrões de agrupamento coerentes com o demonstrado inicialmente com a divisão de quatro

grupos pelo Structure (Figura 3.10b). Para o valor de $k=8$, considerando-se apenas os grupos contendo acessos e ignorando os grupos Indica e Japônica temperado nos quais acessos japoneses não estavam presentes, os acessos foram divididos em seis grupos. Desses seis grupos, o grupo III é constituído por três acessos e outros três acessos são caracterizados por apresentarem mistura dos grupos VI e VII. Os demais acessos foram divididos em três grupos maiores. Marcadores moleculares microssatélites fornecem informações complementares para o entendimento de questões botânicas a nível intraespecífico e relações de acessos de germoplasma com o ambiente de coleta (SANTOS-GARCIA et al., 2012). Entretanto, a falta de informações dos acessos japoneses quanto ao seu ambiente original dificulta o entendimento da relação entre os grupos identificados. Um elemento confundidor quando do estudo de coleções de germoplasma é que os acessos ou variedades são frequentemente estudados de forma isolada e desconectada do seu ambiente original (THOMSON et al., 2009). A disponibilidade de informações poderia permitir a investigação de maneira mais profunda das relações entre as variedades e o seu contexto original.

A caracterização molecular indicou que os acessos japoneses são na sua maioria pertencentes à subespécie Japônica e apresentam menores níveis de diversidade do que a detectada em estudos de escala global, mas apresentam níveis de diversidade equivalentes e superiores aos detectados quando apenas variedades da subespécie Japônica utilizadas nos estudos globais são consideradas.

Referências

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

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

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

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

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; MCCOUCH, S. R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 4, p. 553-567, 1997.

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

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

EARL, D.A.; von HOLDT, B.M. **Structure harvester**. Disponível em: <<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>>. Acesso em: 18 ago. 2011.

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

ELLIS, J.R.; BURKE, J.M. EST-SSRs as a source for population genetic analyses. **Heredity**, London, v. 99, p. 125-132, 2007.

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

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

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

GLASZMANN J.C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 74, p. 21–30, 1987.

JAIN, S.; JAIN, R.; MCCOUCH, S. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of Xuorescently-labeled microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, p. 965–977, 2004.

KOJIMA, Y.; EBANA, K.; FUKUOKA, S.; NAGAMINE, T.; KAWASE, M. Development of a RFLP-based rice diversity research set of germplasm. **Breeding Science**, Tokyo, v. 55, p. 431-440, 2005.

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

KOVACH, M.J.; SWEENEY, M.T.; MCCOUCH, S.R. New insights into the history of rice domestication. **Trends in Genetics**, London, v. 23, p. 578–587, 2007.

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

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

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

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

LU, H.; REDUS, M.A.; COBURN, J.R.; RUTGER, J.N.; MCCOUCH, S.R.; TAI, T. H.; Population structure and breeding patterns of 145 U.S. rice cultivars based on SSR marker analysis. **Crop Science**, Madison, v. 45, p. 66-76, 2005.

NAKAGAHARA, M.; OKUNO, K.; VAUGHAN, D. Rice genetic resources: history, conservation, investigative characterization and use in Japan. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 69-77, 1997.

NEI, M.; TAJIMA, F.A.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 19, p. 153-170, 1983.

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

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P. **DARwin software**. Disponível em: <<http://darwin.cirad.fr>>. Acesso em: 30 jul. 2011.

PESSOA-FILHO, M.; BELÓ, A.; ALCOCHETE, A.; RANGEL, P.; FERREIRA, M. A set of multiplex panels of microsatellite markers for rapid molecular characterization of rice accessions. **BMC Plant Biology**, London, v. 7, p. 1-10, 2007.

PINTO, L.R.; LEITE, D.L.; FÁVERO, T.M.; PASTINA, M.M.; GARCIA, A.A.F.; PERECIN, D.; GONÇALVES, B.S.; CRESTE, S.; XAVIER, M.A.; BIDÓIA, M.A.P.; LANDELL, M.G.; SOUZA, A.P. Identification of microsatellites markers associated with yield components and quality parameters in sugarcane. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 113, p. 56-60, 2011.

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

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publisher, 2000. 98 p.

SANO, R.; MORISHIMA, H. *Indica-japonica* differentiation of rice cultivars viewed from the variation in key characters and isozymes with special reference to land races from the Himalayan hilly areas. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, p. 266–274, 1992.

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

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

SONG, Z.P.; XU, X.; WANG, B.; CHEN, J.K.; LU, B.R. Genetic diversity in the northernmost *Oryza rufipogon* populations estimated by SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 1492–1499, 2003.

STATSOFT. **Electronic statistics textbook**. Disponível em: <<http://www.statsoft.com/textbook/>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

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

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

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

XU, X.; LU, B.R.; CHEN, Y.H.; XU, M.; RONG, J.; YE, P.; CHEN, J.; SONG, Z. Inferring population history from fine-scale spatial genetic analysis in *Oryza rufipogon* (Poaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 1535–1544, 2006.

YU, S.B.; XU, W.J.; VIJAYAKUMAR, C.H.M.; ALI, J.; FU, B.Y.; XU, J.L.; JIANG, Y.Z.; MARGHIRANG, R.; DOMINGO, J.; AQUINO, C.; VIRMANI, S.S.; LI, Z.K. Molecular diversity and multilocus organization of the parental lines used in the International Rice Molecular Breeding Program. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 131–140, 2003.

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

ZHANG, H.; SUN, J.; WANG, M.; LIAO, D.; ZENG, Y.; SHEN, S.; YU, P.; MU, P.; WANG, X.; LI, Z. Genetic structure and phylogeography of rice landraces in Yunnan, China, revealed by SSR. **Genome**, Ottawa, v. 50, p. 72–83, 2007.

ZHOU, H.; XIE, Z.; GE, S. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 332–339, 2003.

4 VARIABILIDADE PARA TOLERÂNCIA AO FRIO NA GERMINAÇÃO EM GERMOPLASMA DE ARROZ DE ORIGEM JAPONESA

Resumo

Baixas temperaturas nos estágios iniciais de desenvolvimento da cultura do arroz impedem a germinação e o rápido estabelecimento de plântulas, causando perdas significativas na produção. No desenvolvimento de cultivares tolerantes ao frio, é necessária a caracterização de recursos genéticos para a introdução de genes envolvidos na tolerância em cultivares elites. A resposta ao frio de acessos foi avaliada em três experimentos; I: 192 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio foram germinados em rolos de papel sob duas condições: 13°C por 28 dias (estresse por frio) e 28°C por sete dias (condições ótimas) e as características estudadas foram comprimento do coleóptilo e radícula em temperatura ótima e sob estresse por frio, e a redução nos comprimentos devido ao frio; II: dezessete acessos selecionados entre os que apresentaram melhores desempenhos na temperatura de 13°C foram avaliados juntamente com as três testemunhas num gradiente de temperaturas: 11°C, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C, e o índice de velocidade de germinação, comprimento do coleóptilo e comprimento da radícula foram avaliados; III: os mesmos acessos do experimento II foram avaliados para germinação e estabelecimento inicial de plântulas em areia a 15°C. A diminuição da temperatura teve efeito significativo no desempenho dos acessos, e a interação genótipo por temperatura foi significativa para comprimento do coleóptilo e índice velocidade de germinação. Entre os acessos estudados foi observada variação genética para as características relacionadas com a germinação em baixa temperatura e encontraram-se acessos com reduções nos comprimentos de coleóptilo e radícula devido ao frio comparáveis com a das testemunhas, embora com rapidez de crescimento menor, inclusive em temperatura ótima.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; Germoplasma; Tolerância ao frio; Baixa temperatura

Abstract

Low temperatures at the initial stages of rice development prevent fast germination and seedling establishment and may cause significant productivity losses. In order to develop rice cultivars exhibiting cold tolerance, it is necessary to investigate genetic resources, providing basic knowledge to allow the introduction of genes involved in low temperature germination ability from accessions into elite cultivars. Accessions response to cold stress at the germination was evaluated in three experiments; I: 192 accessions and three cold-tolerant controls were evaluated under two conditions: 13°C during 28 days (cold stress) and 28°C during seven days (optimal temperature), and the coleoptile and radicle length were measured as well as the coleoptile and radicle reduction due to cold; II: seventeen accessions selected

among those presenting better performance in the first experiment were evaluated along with three cold-tolerant controls under five temperatures: 11°C, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C to study genotype by temperature interaction; III: germination and plantule initial development in sand at 15°C of genotypes used in the second experiment were evaluated. It was detected variability among the accessions to germination under cold stress and the temperature decrease had significant effect for germination velocity index and coleoptile and radicle length. The interaction between genotype and temperature was significant for germination velocity index and coleoptile length and accessions presenting coleoptile and radicle reductions due to cold comparable with cold-tolerant controls were detected.

Keywords: *Oryza sativa*; Gemplasm; Cold tolerance; Low temperature

4.1 Introdução

Embora a espécie *Oryza sativa* tenha origem tropical, o seu cultivo estende-se a regiões subtropicais, temperadas e de grande altitude, nas quais podem ocorrer temperaturas abaixo das ótimas de desenvolvimento da cultura em um ou mais estádios, causando prejuízos na produtividade de grãos. A ocorrência de temperaturas baixas é um problema para a cultura em inúmeros países, dentre os quais Austrália, China, Indonésia, Japão, Coréia, Nepal, Estados Unidos (YOSHIDA, 1981), e sul da América Latina, principalmente Chile (CASTILLO; ALVARADO, 2002) e sul do Brasil (CRUZ; MILACH, 2000). Devido aos vários efeitos da baixa temperatura na cultura do arroz e o sério impacto na produtividade, a tolerância ao frio é de considerável importância nessas regiões onde é comum a ocorrência de frio durante o período de cultivo. Esforços para o desenvolvimento de cultivares com tolerância ao frio têm focado principalmente na germinação, estabelecimento de plântulas e no estágio reprodutivo. No caso da germinação e estabelecimento de plântulas, temperaturas baixas podem impedir e retardar a germinação e o crescimento de plântulas, levando a redução de estande e ao atraso e não uniformidade na maturação (ANDAYA; TAI, 2006).

Para desenvolver cultivares de arroz com características de bom estabelecimento de plântulas sob condições de baixa temperatura, é necessário estudar recursos genéticos de todas as partes do mundo e introduzir genes envolvidos na germinação em baixa temperatura para as cultivares elite (MIURA et al., 2001). Variação genética para tolerância ao frio em estádios iniciais de

desenvolvimento do arroz tem sido reportada em algumas cultivares, particularmente da subespécie Japônica (STHAPIT; WITCOMBRE, 1998). Grande variabilidade para germinação em baixa temperatura foi observada em mais de 700 variedades do Japão, Europa, China, Rússia e outras regiões (KOTAKA; ABE, 1988 apud FUJINO et al., 2004). Também há relatos mostrando que a germinação em condições de baixas temperaturas de cultivares provenientes de áreas de altas latitudes é mais rápida do que a germinação de cultivares provenientes de cultivares de baixas latitudes (TAKAHASHI, 1997), e que cultivares nativas do Japão e da Coréia do Sul apresentaram alta taxa de germinação em baixas temperaturas, sendo capazes de germinar em temperatura de 8°C, enquanto que cultivares *indica* apresentam baixa germinação (LEE; TAGUCHI, 1969 apud TAKAHASHI, 1997).

Embora cultivares Japônica sejam geralmente mais tolerantes ao frio do que cultivares Indica, há um grande nível de variação dentro de cada grupo (SAITO et al., 2004; CRUZ; MILACH, 2004). Cultivares do tipo Japônica tropical geralmente apresentam características intermediárias entre Japônica temperado e Indica, entretanto não há diferença para tolerância ao frio em plântulas entre os grupos Japônica tropical e temperado. Embora sejam associadas a ambientes tropicais, as cultivares Japônica tropical possuem muitas das características relativas à adaptação a baixas temperaturas apresentadas pelas cultivares Japônica temperado (MACKILL; LEI, 1997). A adaptação para baixa temperatura foi fortemente selecionada para o cultivo nas regiões temperadas do nordeste da Ásia (China, Coréia e Japão). O cultivo de muitas variedades Japônica em áreas elevadas do sudeste da Ásia pode também ter dado a elas características associadas com a adaptação a baixa temperatura. Adicionalmente, há relatos de que a variação genética para tolerância ao frio tem sido associada com a sua distribuição geográfica, gerando a hipótese de que a diferenciação genética da tolerância ao frio seja resultado de adaptação regional (BARUAH et al., 2009). Embora haja substancial quantidade de variabilidade genética em arroz para germinação em baixa temperatura, tem sido difícil melhorar os níveis de tolerância ao frio em programas de melhoramento por sua herança quantitativa não ter sido perfeitamente elucidada (FUJINO et al., 2004).

A dificuldade de se selecionar para tolerância ao frio a campo levou a necessidade de se utilizar condições controladas. Esta abordagem permite a identificação mais precisa de cultivares tolerantes ao frio do que é possível em condições de campo, onde o grau e a duração do período de baixa temperatura é altamente variável (FARREL et al., 2006). Avaliações baseadas na altura de plântula em condições controladas são um indicador satisfatório do desempenho no campo para número de dias para emergência, porcentagem de emergência e índice de emergência (JONES; PETERSON, 1976). O crescimento do coleóptilo está correlacionado com o estabelecimento de plântulas sob baixas temperaturas (OGIWARA; TERASHIMA, 2001).

Métodos de avaliação da tolerância ao frio no estágio de germinação foram desenvolvidos e permitem a caracterização de genótipos tolerantes e suscetíveis (JONES; PETERSON, 1976; CRUZ; MILACH, 2004) e estão disponíveis para a identificação de fontes de tolerância nos bancos de germoplasma. Eles consistem basicamente na germinação de sementes em baixas temperaturas sob condições controladas, avaliando-se características como índice de germinação, comprimento da radícula e comprimento do coleóptilo. Esses métodos têm sido utilizados em estudos do controle genético da tolerância ao frio na germinação (STHAPIT; WITCOMBRE, 1998; CRUZ et al., 2004), mapeamento de QTLs (MIURA et al., 2001; FUJINO et al., 2004) e na caracterização de germoplasma (CASTILLO; ALVARADO, 2002; SHARIFI, 2010; SHARIFI; AMINPANAH, 2010).

O Departamento de Genética da ESALQ/USP possui um banco de germoplasma de arroz cultivado com 192 acessos originários do Japão, de região de latitude similar à região produtora no sul do Brasil, onde é comum a ocorrência de baixas temperaturas na época de cultivo. Há relatos de que sementes de arroz de várias regiões do Japão apresentam alta germinação em condições de baixa temperatura (TAKAHASHI, 1997), sendo um indicativo de que, dentre os acessos japoneses do banco de germoplasma podem ser encontradas fontes de tolerância ao frio na germinação e desenvolvimento inicial de plântula. O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade para tolerância ao frio na germinação entre os acessos japoneses do Banco de Germoplasma de arroz da ESALQ.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material Vegetal

Sementes uniformes e íntegras de 192 acessos de arroz de origem japonesa (ANEXO A) e de três testemunhas tolerantes ao frio (CT 6748-8CA-17P, L 201 e QUILLA 66304) foram selecionadas para utilização no experimento. Os genótipos foram avaliados previamente quanto à germinação através de um teste padrão com 200 sementes, em um germinador tipo Mangelsdorf na temperatura de 25°C segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

4.2.2 Avaliação da tolerância ao frio

Experimento I: Germinação a 13°C e 28°C

Vinte sementes dos 192 acessos e das testemunhas foram colocadas para germinar sob duas condições: 13°C por 28 dias (tratamento de frio) e 28°C por sete dias (controle). As sementes foram colocadas para germinar em rolos de papel toalha tipo Germitest® (3 folhas por rolo) umedecido com volumes de água (em mL) equivalente a 2,5 vezes a massa do substrato (g). Os rolos com as sementes foram acondicionados em sacos plásticos transparentes de 0,05 mm de espessura e colocados em câmaras de germinação BOD reguladas para as temperaturas do experimento. O experimento foi conduzido no delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições e a parcela experimental foi representada por um rolo de papel de germinação com 20 sementes (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Representação da parcela experimental no momento da avaliação

Os comprimentos do coleóptilo (CC) e da radícula (CR) das sementes germinadas a 13°C foram medidos aos 28 dias após o início do experimento e para as sementes germinadas a 28°C foram medidos aos sete dias. As porcentagens de redução no comprimento do coleóptilo (RC) e da radícula (RR) foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula (CRUZ; MILACH, 2004):

$$\%RC \text{ ou } RR = \left(\frac{CC \text{ ou } CR \text{ a } 13^{\circ}C \times 100}{CC \text{ ou } CR \text{ a } 28^{\circ}C} \right) - 100$$

Em que os CC e CR são as médias comprimentos do coleóptilo e da radícula das 20 sementes avaliadas por repetição por acesso.

Experimento II: Germinação em gradiente de temperaturas

O espaço disponível na mesa termogradiante para a faixa de cada temperatura restringiu o número de genótipos avaliados em 20. Dessa forma, fez-se necessário a seleção de 17 acessos para serem submetidos ao experimento juntamente com as três testemunhas de tolerância ao frio. Para estudar o efeito das diferentes temperaturas na germinação, foram selecionados acessos entre os que apresentaram maior tolerância ao frio com base nos resultados obtidos no experimento I.

As sementes foram colocadas para germinar em placas de petri em mesa termogradiante nas temperaturas de 11°C, 13°C, 15°C e 17°C por um período de 21 dias e 28°C por 7 dias. Foram utilizadas 10 sementes por placa de petri de cada acesso em cada temperatura. O experimento constituído por dois fatores (acessos e temperaturas) foi conduzido no delineamento em blocos ao acaso, com três repetições e no delineamento de tratamentos em parcelas subdivididas, sendo que as diferentes temperaturas (linha da mesa termogradiante com a respectiva temperatura) foram consideradas como parcela e os acessos (placa de petri com 10 sementes do respectivo acesso) foram considerados sub parcelas (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Representação das parcelas e subparcelas correspondentes às cinco temperaturas (11°C, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C, fileiras da esquerda para a direita) e aos vinte genótipos (cada placa de petri conteve um genótipo) avaliados em cada temperatura

As características avaliadas nesse experimento foram índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do coleóptilo (CC) e comprimento da radícula (CR). Foram feitas contagens em dias intercalados do número de sementes germinadas para obtenção do índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Em que

G_1, G_2, G_n : número de plântulas germinadas, computadas na primeira, segunda, até a última contagem;

N_1, N_2, N_n : número de dias da semeadura à primeira, segunda até a última contagem.

Experimento III: Tolerância ao frio na fase de germinação-emergência e desenvolvimento inicial

Os 20 genótipos avaliados no experimento II foram semeados em bandejas e estas foram colocadas em câmara de germinação BOD regulada para a temperatura de 15°C por 28 dias. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas (Figura 4.3) com areia peneirada e previamente esterilizada, utilizada como substrato. A semeadura foi realizada com a areia umedecida até a capacidade de campo, com profundidade de 1cm e com espaçamento de 20 mm entre covas e fileiras.

Figura 4.3 - Representação do experimento de germinação em areia de dezessete acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio

O número de plântulas emergidas foi contado em dias alternados para avaliação do índice de emergência (JONES; PETERSON, 1976):

$$IE = \sum_{n=0}^{t-1} \frac{X_n(t-n)}{t}$$

Em que

X_n : é o número total de plântulas emergidas na n-ésima contagem;

n : é o número da contagem, com $n = 0, 1, 2, \dots, t$;

t : é o total de contagens realizadas.

As características avaliadas foram: índice de emergência (IE), comprimento do coleóptilo (CC), comprimento da radícula (CR) e produção de matéria seca (MS).

As plântulas de cada parcela foram retiradas do substrato, armazenadas em envelopes de papel e colocadas para secagem em estufa a 65°C por três dias. Posteriormente, foram pesadas em balança de precisão para determinação da massa de matéria seca. O experimento foi conduzido no delineamento experimental de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo que a parcela experimental consistiu de uma fileira de 10 sementes de cada acesso e das testemunhas tolerantes.

4.2.3 Análise de dados

Experimento I

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de resíduo para verificar a normalidade e a homogeneidade das variâncias e à análise de regressão para testar a necessidade de transformação. A análise de regressão indicou a necessidade de transformar RC e RR através do arco seno. Os dados foram então submetidos à análise de variância univariada e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott.

Estimativas da variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genotípica (σ_g^2), herdabilidade no sentido amplo (h^2), coeficiente de variação genético (CVg) e a razão entre coeficiente de variação genético e ambiental (CVg/CVe) foram obtidas.

As correlações entre as características estudadas foram estabelecidas através do coeficiente de correlação de Pearson e a análise de componentes

principais foi utilizada para resumir as informações do comportamento dos genótipos para a tolerância ao frio considerando-se as quatro características simultaneamente e para a seleção de acessos mais tolerantes. As análises foram feitas usando os programas SAS (SAS Institute, 2001) e Genes (CRUZ, 2001).

Experimento II

Os dados obtidos no experimento II foram submetidos à análise de variância de acordo com o esquema em parcelas subdivididas conduzido em blocos ao acaso:

$$Y_{ijk} = \mu + b_j + t_i + et_{ij} + g_k + tg_{ik} + e_{ijk}$$

Em que

Y_{ijk} : é o valor correspondente à ijk -ésima observação referente a i -ésima temperatura (parcela) e o k -ésimo acesso (subparcela) no j -ésimo bloco;

μ : é a média geral;

b_j : é o efeito do j -ésimo bloco ($j = 1, 2, \dots, J$);

t_i : é o efeito da i -ésima temperatura ($i = 1, 2, \dots, I$);

et_{ij} : é o efeito do erro experimental associado à parcela t_{ij} ;

g_k : é o efeito do k -ésimo acesso ($k = 1, 2, \dots, K$);

tg_{ik} : é o efeito da interação entre a temperatura i e o acesso k ;

e_{ijk} : é o efeito do erro experimental associado à observação Y_{ijk} ; admite-se que o erro tem distribuição normal e é independentemente distribuído com média zero e variância σ^2 .

A análise de regressão foi utilizada para calcular a temperatura base, abaixo da qual não há germinação de cada genótipo. O IVG foi submetido à análise de regressão linear como função de temperatura para cada genótipo. O intercepto no eixo x para cada uma das regressões foi a estimativa da temperatura base, calculada como $-a/b$, onde a e b são o coeficiente linear (intercepto) e o coeficiente angular (slope) para cada uma das regressões, respectivamente.

Experimento III

Os dados obtidos nos experimentos III foram submetidos à análise de variância de acordo com o modelo de blocos ao acaso:

$$Y_{ij} = \mu + b_j + g_i + e_{ij}$$

Em que

Y_{ij} : é o valor correspondente à ij-ésima observação referente ao i-ésimo tratamento (acesso) no j-ésimo bloco;

μ : é a média geral;

g_i : é o efeito do i-ésimo tratamento ($i = 1, 2, \dots, I$);

b_j : é o efeito do j-ésimo bloco ($j = 1, 2, \dots, J$);

e_{ij} : é o efeito do erro experimental associado à observação Y_{ij} ; admite-se que o erro tem distribuição normal e é independentemente distribuído com média zero e variância σ^2 .

Nos experimentos II e III, as médias dos acessos foram comparadas pelo teste de Tukey.

4.3 Resultados

4.3.1 Experimento I: Germinação a 13°C e 28°C

Variação das características associadas com a tolerância ao frio

Houve variabilidade entre genótipos para tolerância ao frio na germinação. A análise de variância detectou diferença significativa entre genótipos para todas as características avaliadas na germinação a 28°C (controle) e a 13°C (frio), e também para as que levaram em consideração o frio em relação ao controle (Tabela 4.1). O desdobramento de genótipos em acessos e testemunhas na análise de variância

permitiu detectar diferença significativa em todas as características avaliadas para acessos e em duas características para as testemunhas (CR e RR). O contraste entre médias de testemunhas e acessos permitiu a detecção de diferença significativa para RC e RR devido ao frio, CC e CR a 13°C e CC a 28°C. As testemunhas apresentaram maiores valores para CC e CR, e consequentemente, valores menores para RC e RR, pois estas características são obtidas pela comparação dos CC e CR em condições de frio (13°C) e em temperatura ótima de germinação para a cultura (28°C).

Os valores máximo e mínimo observados para o comprimento do coleóptilo e da raiz foram observados para genótipos diferentes nas temperaturas de 28°C (controle) e 13°C (tratamento frio). A 28°C, os acessos 113J - Kyuushuu e 107J - Oiran apresentaram os maiores valores para CC e CR, respectivamente, e os acessos 197J - Toga e 129J - Esojima Mochi apresentaram os menores valores. A 13°C, a testemunha QUILLA 66304 apresentou os maiores valores entre as testemunhas e também entre os acessos, tanto para CC como para CR. Entre os acessos, os maiores valores foram observados para os acessos 236J - Toga para CC e 80J - Sangoku para CR. Os menores valores para as duas características também foram observadas para um mesmo genótipo, o acesso 413J - Chousen.

A testemunha CT 6748-8CA-17P destacou-se por apresentar o menor valor para RR, enquanto que o acesso 312J - Col/Ooita/1964 destacou-se por apresentar o menor valor para RC, embora esse acesso não tenha se destacado com maior CC a 13°C. Os maiores valores de redução no comprimento devido ao frio, tanto para coleóptilo como para radícula foram observados para um mesmo genótipo, o acesso 413J- Chousen que também apresentou os menores valores para CC e CR a 13°C.

Tabela 4.1 - Resumo da análise de variância para comprimentos do coleóptilo e da radícula de sementes germinadas sob temperatura ótima (CC28 e CR28) e sob estresse por frio (CC13 e CR13), e para redução nos comprimentos do coleóptilo (RC) e da radícula (RR) devido ao frio avaliadas em 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio

Fonte de variação	GL	QM					
		Temperatura ótima – controle (28°C)		Frio (13°C)		Frio/Temperatura ótima	
		CC28	CR28	CC13	CR13	RC	RR
Bloco	2	330,888	903,004	12,626	34,349	2,324,314	1,523,322
Genótipos	194	1,702**	8761**	0,365**	0,782**	65,147**	33,803**
Acessos (A)	191	1,472**	8,784**	0,29**	0,691**	65,290**	31,147**
Testemunhas (T)	2	0,0751 ^{ns}	6,662 ^{ns}	0,39 ^{ns}	4,6**	22,521 ^{ns}	101,171**
A vs T	1	48,669**	8,493 ^{ns}	14,544**	10,356**	123,186*	406,287**
Resíduo	388	0,316	4,408	0,191	0,489	30,772	17,710
CV (%)		11,045	14,905	31,49	42,19	9,467	5,983
Média		5,094	14,086	1,388	1,657	58,592	70,328
Média acessos		5,050	14,105	1,368	1,641	58,650	70,432
Média test		7,920	12,906	2,649	2,722	54,921	63,661
Mínimo		3,125 (197J)	6,604 (129J)	0,558 (413J)	0,436 (413J)	46,764 (312J)	59,935 (CT6748)
Máximo		9,901(113J)	18,447 (107J)	2,921 (QUILLA)	3,884 (QUILLA)	73,443 (413J)	79,807 (413J)

*, **: Significativo a 5% e a 1% pelo teste F, respectivamente e ^{ns}: não significativo

Os genótipos foram divididos pela análise de comparação de médias de Scott-Knott em dois grupos para comprimento do coleóptilo avaliado sob estresse por frio e em quatro grupos sob temperatura ótima (Figura 4.4). Todas as testemunhas tolerantes ao frio foram incluídas no grupo com maiores CC a 13°C e foram acompanhadas nesse grupo por 71 acessos.

Figura 4.4 - Médias dos comprimentos do coleóptilo sob estresse por frio (13°C) e temperatura ótima (28°C) de 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes avaliados para tolerância ao frio na germinação. Linhas verticais e horizontais representam a separação de grupos de médias identificados pelo teste de Scott-Knott a 5%

Para comprimento da radícula, os genótipos foram divididos em dois grupos, tanto sob estresse por frio, quanto em temperatura ótima (Figura 4.5). As testemunhas CT6748-8CA-17P e QUILLA 66304 pertenceram ao grupo com maiores valores para CR a 13°C e foram acompanhadas por 80 acessos. A testemunha L 201 acompanhou o grupo de acessos com menores valores para CR.

Figura 4.5 - Médias dos comprimentos da radícula sob estresse por frio (13°C) e temperatura ótima (28°C) de 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes avaliados para tolerância ao frio na germinação. Linhas verticais e horizontais representam a separação de grupos de médias identificados pelo teste de Scott-Knott a 5%

Quando os comprimentos do coleótilo e da radícula avaliados a 13°C foram comparados com os avaliados a 28°C para obtenção da porcentagem de redução do comprimento devido ao estresse por frio, os genótipos foram divididos em dois grupos para as duas características (Figura 4.6). Todas as testemunhas tolerantes ao frio pertenceram ao grupo com menores RC e foram acompanhadas por 90 acessos nesse grupo. Para RR, as testemunhas CT6748-8CA-17P e QUILLA 66304 pertenceram ao grupo com menores valores juntamente com 111 acessos enquanto que a testemunha L 201 acompanhou o grupo de acessos com maiores valores para RR.

Figura 4.6 - Médias das reduções nos comprimentos do coleóptilo e da radícula devido ao estresse por frio de 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes avaliados para tolerância ao frio na germinação. Linhas verticais e horizontais representam a separação de grupos de médias identificados pelo teste de Scott-Knott a 5%

Estimativas de parâmetros genéticos

Estimativas da variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genotípica (σ_g^2), herdabilidade no sentido amplo (h^2), coeficiente de variação genética (CVg) e relação CVg/CVe são apresentadas na Tabela 4.2.

A estimativa do CVg foi maior para CR a 13°C e menor para RR. A relação CVg/CVe foi maior para as características avaliadas sob temperatura ótima do que as avaliadas sob estresse, e mostrou que existe situação favorável à seleção (valores maior que 1) somente para CC a 28°C.

A herdabilidade variou de 37,43% para CR a 13°C a 81,39% para CC a 28°C. Embora a estimativa tenha sido alta para CC a 28°C a 13°C foi intermediária (47,63%). Para CR, a estimativa de herdabilidade também foi menor na germinação a 13°C do que a 28°C. Entre as características que foram mensuradas com o

tratamento de frio e em comparação entre condições de estresse por frio e ótima, a maior herdabilidade foi observada para RC.

Tabela 4.2 - Variância fenotípica (σ_p^2), variância ambiental (σ_e^2), variância genotípica (σ_g^2), herdabilidade (h^2), coeficiente de variação genético (CV_g) e CV_g/CV_e para comprimentos de coleóptilo e radícula avaliados em temperatura ótima e sob estresse por frio e redução nos comprimentos devido ao frio avaliados em 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio na germinação

Característica	σ_p^2	σ_e^2	σ_g^2	h^2	$CV_g(\%)$	CV_g/CV_e
RC	21,715	10,257	11,458	52,764	5,777	0,61
RR	11,267	5,903	5,364	47,606	3,293	0,55
CC13	0,121	0,064	0,058	47,629	17,338	0,55
CR13	0,261	0,163	0,098	37,432	18,842	0,446
CC28	0,851	0,158	0,693	81,395	16,336	1,479
CR28	4,380	2,204	2,176	49,680	10,472	0,702

Correlação entre as características avaliadas

As características avaliadas em condição de frio e estas quando da comparação do desempenho sob estresse por frio e temperatura ótima apresentaram correlação significativa (Tabela 4.3). O comprimento do coleóptilo foi significativamente correlacionado com o comprimento da radícula tanto a 13°C como a 28°C, sendo que a 13°C o valor foi maior do que a 28°C. As correlações entre comprimento do coleóptilo e comprimento da radícula a 13°C com suas respectivas medidas a 28°C foram baixas. As reduções nos comprimentos do coleóptilo e da radícula foram altamente correlacionadas, negativamente correlacionadas com os comprimentos apresentados por coleóptilo e radícula a 13°C e positivamente correlacionados com os comprimentos a 28°C.

Tabela 4.3 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as seguintes características: redução no comprimento do coleóptilo (RC), redução no comprimento da radícula (RR), comprimento do coleóptilo sob estresse por frio (CC13), comprimento da radícula sob estresse por frio (CR13), comprimento do coleóptilo em temperatura ótima (CC28) e comprimento da radícula em temperatura ótima (CR28) avaliadas em 195 genótipos de arroz

Característica	RC	RR	CC13	CR13	CC28	CR28
RC	1,00	0,770**	-0,768**	-0,684**	0,434**	0,209**
RR		1,00	-0,737**	-0,869**	0,126	0,332**
CC13			1,00	0,807**	0,209**	0,054
CR13				1,00	0,074	0,145*
CC28					1,00	0,366**
CR28						1,00

*** Significativo a 5% e 1%, respectivamente.

Análise de componentes principais

A análise de componentes principais das quatro características associadas com o comportamento dos genótipos sob baixa temperatura revelou que os três primeiros componentes principais contribuíram para 97,8% do total da variação para tolerância ao frio (Tabela 4.4). Aproximadamente 83% da variação total foi explicada pelo primeiro componente principal, que representa um contraste entre as características avaliadas a 13°C (CC13 e CR13) que apresentaram coeficiente negativo, e as obtidas pela comparação do desempenho dos genótipos no frio e em temperatura ótima (RC e RR), que apresentaram coeficiente positivo nesse componente.

Tabela 4.4 - Componentes principais de quatro características usadas para avaliar a tolerância ao frio em 192 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio

Característica	Autovetores		
	CP1	CP2	CP3
RC	0,4841	0,7480	0,3186
RR	0,5094	-0,3048	0,5439
CC13	-0,4988	-0,1619	0,7708
CR13	-0,5073	0,5669	0,0922
Autovalor	3,318	0,333	0,258
Variância total explicada no CP (%)	82,968	8,346	6,473
Variância total acumulada (%)	82,968	91,315	97,789

Usando os escores dos genótipos para o primeiro componente principal, o contraste permitiu a identificação e seleção de acessos com maiores valores para comprimentos de coleóptilo e radícula a 13°C e menores valores de reduções do coleóptilo e da radícula devido ao frio. Genótipos apresentando médias altas para redução no comprimento do coleóptilo e da radícula e médias baixas para comprimento a 13°C receberam maiores escores para o primeiro componente principal e são sensíveis ao frio. Por outro lado, os genótipos apresentando médias baixas para RC e RR, e médias altas para CC e CR a 13°C receberam escores com valores menores e são tolerantes ao frio. Como demonstrado na Figura 4.7, alguns acessos tiveram escores próximos aos obtidos para as testemunhas tolerantes ao frio.

Figura 4.7 - Distribuição dos 192 acessos japoneses e das três testemunhas tolerantes ao frio conforme os escores para os dois primeiros componentes principais

Um total de 50 acessos apresentou escores intermediários entre as testemunhas QUILLA 66304 e L 201 para o primeiro componente principal; QUILLA

66304 teve o menor escore entre todos os genótipos avaliados, enquanto L 201 apresentou o maior escore entre as testemunhas. Os acessos com valores intermediários entre estas duas testemunhas apresentam bom desempenho para a germinação em condições de estresse por frio, aliando maiores comprimentos de coleóptilo e radícula a 13°C e baixas reduções nos comprimentos devido ao frio, quando comparados com os apresentados em temperatura ótima.

4.3.2 Experimento II: Germinação em gradiente de temperaturas

Através da análise de variância para o experimento em parcelas subdivididas em que a temperatura foi considerada como parcela e os genótipos como subparcela, o efeito de temperatura foi significativo para as três características avaliadas: índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do coleóptilo (CC) e comprimento da radícula (CR). Houve diferença significativa entre genótipos para IVG e CC, e a interação genótipo por temperatura foi significativa para IVG e CC (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Resumo da análise de variância para Índice de velocidade de germinação (IVG), Comprimento do coleóptilo (CC) e Comprimento da radícula (CR) avaliados em 17 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio em cinco temperaturas diferentes (11°, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C)

FV	GL	QM		
		IVG	CC	CR
Blocos	2	0,484	0,205	0,603
Temperatura (T)	4	395,742**	39,018**	256,549**
Resíduo (a)	8	0,925	0,835	0,408
Genótipos (G)	19	0,940**	0,672**	0,209
Interação G x T	76	0,292**	0,340**	0,163
Resíduo (b)	190	0,156	0,095	0,149
CV (%)		15,94	43,48	27,59

** Significativo a 1% pelo teste F.

O teste F também foi utilizado para estudar a diferença no desempenho dos genótipos em cada temperatura e o efeito da temperatura no desempenho de cada genótipo para as três características avaliadas. Diferenças significativas entre

genótipos foram detectadas para índice de velocidade de germinação a 13°C, 15°C, 17°C e 28°C. Para os comprimentos do coleóptilo e da radícula, diferenças entre genótipos foram observadas a 17°C e 28°C (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Resumo da análise de variância para genótipos dentro de temperatura para as características índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do coleóptilo (CC) e comprimento da radícula (CR) avaliados em dezessete acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio

FV	GL	QM		
		IVG	CC	CR
Genótipo d. 11°C	19	0,0786	0,0072	0,0039
Genótipo d. 13°C	19	0,2818*	0,0116	0,0107
Genótipo d. 15°C	19	0,6317**	0,0425	0,0214
Genótipo d. 17°C	19	0,4454**	0,3779**	0,2501*
Genótipo d. 28°C	19	0,6717**	1,5935**	0,5736**
Resíduo (b)	190	0,1556	0,0954	0,1491

*, ** Significativo a 5% e a 1% pelo teste F.

No estudo do efeito da temperatura no desempenho de cada genótipo observou-se que a temperatura teve efeito significativo para os dezessete acessos japoneses e para as três testemunhas tolerantes ao frio, sendo observadas diferenças para IVG, CC e CR de um mesmo genótipo na germinação em diferentes temperaturas. O resumo da análise de variância para o efeito de temperatura dentro de genótipo para IVG, CC e CR é apresentado na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Resumo da análise de variância para os efeitos da temperatura no desempenho de cada um dos vinte genótipos de arroz para as características índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento do coleóptilo (CC) e comprimento da radícula (CR)

FV	IVG		CC		CR	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Temperatura d. 312J	4	9,689**	4	0,797**	4	1,546**
Temperatura d. 400J	4	10,672**	4	0,558**	4	1,595**
Temperatura d. 294J	4	7,359**	4	0,613**	4	1,640**
Temperatura d. 74J	4	12,659**	4	0,430*	4	1,718**
Temperatura d. 278J	4	9,758**	4	0,815**	4	1,539**
Temperatura d. 279J	4	6,264**	4	0,734**	4	1,820**
Temperatura d. 386J	4	10,745**	4	0,814**	4	1,673**
Temperatura d. 415J	4	9,383**	4	0,645**	4	1,231**
Temperatura d. 325J	4	11,776**	4	0,683**	4	1,309**
Temperatura d. 310J	4	8,898**	4	0,699**	4	2,024**
Temperatura d. 122J	4	10,536**	4	0,984**	4	1,576**
Temperatura d. 24J	4	7,633**	4	0,317*	4	1,621**
Temperatura d. 407J	4	13,091**	4	0,602**	4	2,049**
Temperatura d. 402J	4	7,813**	4	0,607**	4	1,982**
Temperatura d. 320J	4	5,887**	4	1,051**	4	1,826**
Temperatura d. 217J	4	7,818**	4	0,737**	4	2,020**
Temperatura d. 256J	4	9,653**	4	2,267**	4	1,063**
Temperatura d. L201	4	3,707**	4	2,577**	4	1,790**
Temperatura d. Quilla 66304	4	8,440**	4	2,493**	4	1,854**
Temperatura d. CT6748	4	13,182**	4	5,428**	4	1,425**
Resíduo médio	99	0,194	67	0,132	167	0,162

*,** Significativo a 5% e a 1% pelo teste F.

As médias dos diferentes genótipos dentro de cada temperatura e de um mesmo genótipo nas diferentes temperaturas foram estudadas.

Temperaturas abaixo da temperatura ótima para a germinação de arroz tiveram efeito na redução do IVG para todos os genótipos. As maiores médias foram apresentadas pelos genótipos a 28°C, que apresentaram redução com o decréscimo da temperatura. Diferenças entre genótipos foram detectadas a 13°C, 15°C, 17°C e 28°C (Tabela 4.8), com maiores diferenças entre os IVG apresentados pelos genótipos a 28°C. A 13°C, a testemunha L 201 apresentou maior IVG em relação ao acesso 325J - Gaisen Mochi 909, e a 15°C, L 201 apresentou maior IVG do que a testemunha CT6748-8CA-17P e do que 13 acessos japoneses. A 17°C as testemunhas L 201 e QUILLA 66304 juntamente com os acessos 217J e 386J apresentaram maior IVG do que o acesso 325J - Gaisen Mochi 909, e a 28°C, a

testemunha CT6748-8CA-17P e o acesso 386J apresentaram maior IVG do que quatro acessos (294J - Col/Miyazaki/1963, 279J - Ootama, 415J - Tosa Mochi e 320J - Nourin Mochi 2).

Tabela 4.8 – Comparação de médias do índice de velocidade de germinação de 20 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio) dentro de cada temperatura e de temperaturas dentro de cada genótipo

Genótipo	Temperatura				
	11°C	13°C	15°C	17°C	28°C
312J	0,193 a C*	0,969 ab C	1,871 ab B	2,624 ab B	6,942 abc A
400J	0,081 a D	0,755 ab D	1,644 b C	2,599 ab B	6,845 abc A
294J	0,000 a D	0,971 ab C	1,337 b C	2,331 ab B	5,856 c A
74J	0,175 a D	0,841 ab CD	1,364 b C	2,352 ab B	7,262 ab A
278J	0,413 a D	0,737 ab CD	1,604 b BC	2,251 ab B	6,789 abc A
279J	0,426 a D	1,284 ab CD	1,397 b C	2,362 ab B	6,142 bc A
386J	0,311 a D	1,094 ab D	1,977 ab C	3,040 a B	7,512 a A
415J	0,000 a C	0,400 b C	1,697 b B	2,344 ab B	6,186 bc A
325J	0,121 a C	0,877 ab BC	0,916 b BC	1,656 b B	6,675 abc A
310J	0,256 a D	1,155 ab C	1,479 b C	2,900 ab B	6,779 abc A
122J	0,452 a D	0,858 ab D	1,876 ab C	2,876 ab B	7,342 ab A
24J	0,261 a C	1,063 ab C	2,175 ab B	2,578 ab B	6,645 abc A
407J	0,000 a D	0,496 ab CD	1,284 b C	2,537 ab B	7,012 abc A
402J	0,296 a D	0,986 ab CD	1,832 ab C	2,849 ab B	6,583 abc A
320J	0,296 a D	1,254 ab C	1,581 b C	2,722 ab B	6,064 bc A
217J	0,376 a D	0,873 ab CD	1,703 b C	3,288 a B	6,550 abc A
256J	0,284 a D	0,911 ab CD	1,611 b C	2,855 ab B	6,895 abc A
L201	0,593 a D	1,729 a C	3,100 a B	3,003 a B	6,836 abc A
Quilla 66304	0,185 a D	1,414 ab C	2,182 ab C	3,275 a B	7,175 ab A
CT6748-8CA-17P	0,140 a D	1,266 ab C	1,230 b C	2,760 ab B	7,595 a A

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%

As temperaturas baixas tiveram efeito na redução do CC para todos os genótipos, sendo que os maiores comprimentos foram apresentados a 28°C, e os menores a 11°C. Diferenças entre genótipos foram detectadas a 17°C e 28°C (Tabela 4.9).

Para CC, conforme detectado anteriormente pela análise de variância, não há diferença entre genótipos a 13°C e a 15°C. Na temperatura de 17°C, a testemunha CT6748-8CA-17P apresentou comprimento significativamente maior do que os

acessos 74J - Aichi Rikutou 1, 325J - Gaisen Mochi 909, 24J - Wase Mochi e 320J - Nourin Mochi 2, 278J - Urasar e 407J – Edogawa. A 28°C, a testemunha CT6748-8CA-17P apresentou comprimento do coleóptilo maior do que todos os acessos japoneses. As outras duas testemunhas, QUILLA 66304 e L 201 não diferiram de apenas quatro e um acesso, respectivamente.

Tabela 4.9 – Comparação de médias do comprimento do coleóptilo (cm) de 20 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio) dentro de cada temperatura e de temperaturas dentro de cada genótipo

Genótipo	Temperatura				
	11°C	13°C	15°C	17°C	28°C
312J	0,050 a C*	0,164 a C	0,349 a BC	0,977 abc B	1,826 de A
400J	0,067 a C	0,129 a BC	0,321 a BC	0,803 abc B	1,560 e A
294J	0,000 a C	0,233 a BC	0,217 a BC	0,763 abc B	1,574 e A
74J	0,083 a B	0,133 a B	0,372 a B	0,621 bc B	1,450 e A
278J	0,147 a B	0,072 a B	0,317 a B	0,671 bc B	1,821 de A
279J	0,072 a B	0,175 a B	0,304 a B	1,308 abc A	1,668 e A
386J	0,085 a C	0,258 a BC	0,416 a BC	0,920 abc B	1,982 cde A
415J	0,000 a C	0,083 a C	0,327 a BC	0,933 abc AB	1,545 e A
325J	0,044 a B	0,150 a B	0,132 a B	0,494 bc B	1,563 e A
310J	0,058 a B	0,179 a B	0,260 a B	1,157 abc A	1,643 e A
122J	0,108 a C	0,098 a C	0,408 a BC	0,835 abc B	2,017 cde A
24J	0,100 a B	0,223 a B	0,549 a B	0,401 c B	1,390 e A
407J	0,000 a B	0,109 a B	0,495 a B	0,686 bc B	1,607 e A
402J	0,100 a C	0,138 a C	0,304 a BC	0,986 abc AB	1,622 e A
320J	0,117 a B	0,242 a B	0,481 a B	0,556 bc B	2,144 cde A
217J	0,104 a C	0,133 a C	0,370 a BC	1,033 abc B	1,796 de A
256J	0,067 a C	0,079 a C	0,346 a BC	0,920 abc B	2,783 bcd A
L201	0,201 a C	0,284 a C	0,537 a C	1,561 ab B	3,322 ab A
Quilla 66304	0,100 a C	0,187 a C	0,440 a C	1,139 abc B	3,062 abc A
CT6748-8CA-17P	0,089 a C	0,207 a C	0,106 a C	1,855 a B	4,123 a A

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%

Para CR, a exemplo do observado para CC, as temperaturas baixas tiveram efeito na redução do comprimento para todos os genótipos, sendo que os maiores comprimentos foram apresentados a 28°C, e os menores a 11°C. Diferenças entre genótipos em uma mesma temperatura foram detectadas somente a 28°C (Tabela 4.10), em que o acesso 407J – Edogawa apresentou maior média do que três acessos (415J - Tosa Mochi, 325J - Gaisen Mochi 909 e 256J - Shizuoka) e do que a testemunha CT6748-8CA-17P.

Tabela 4.10 - Comparação de médias do CR (cm) de 20 genótipos de arroz (192 acessos japoneses e três testemunhas tolerantes ao frio) dentro de cada temperatura e de temperaturas dentro de cada genótipo

Genótipo	Temperatura					
	11°C	13°C	15°C	17°C	28°C	
312J	0.060 a B*	0.329 a B	0.621 a B	0.834 a B	4.901 abcd	A
400J	0.100 a C	0.262 a BC	0.444 a BC	1.053 a B	4.963 abcd	A
294J	0.000 a C	0.358 a BC	0.522 a BC	0.940 a B	5.045 abcd	A
74J	0.100 a C	0.278 a BC	0.594 a BC	1.032 a B	5.150 abcd	A
278J	0.056 a B	0.243 a B	0.519 a B	0.916 a B	4.891 abcd	A
279J	0.083 a C	0.321 a C	0.650 a BC	1.219 a B	5.264 abc	A
386J	0.067 a C	0.241 a C	0.570 a BC	1.208 a B	5.046 abcd	A
415J	0.000 a B	0.156 a B	0.518 a B	0.782 a B	4.377 cd	A
325J	0.050 a B	0.221 a B	0.376 a B	0.868 a B	4.515 bcd	A
310J	0.062 a C	0.325 a C	0.488 a C	1.641 a B	5.480 abc	A
122J	0.100 a B	0.198 a B	0.592 a B	0.884 a B	4.952 abcd	A
24J	0.033 a B	0.322 a B	0.677 a B	0.863 a B	5.013 abcd	A
407J	0.000 a B	0.128 a B	0.552 a B	0.768 a B	5.693 a	A
402J	0.083 a C	0.314 a BC	0.670 a BC	1.131 a B	5.525 abc	A
320J	0.083 a B	0.317 a B	0.671 a B	0.812 a B	5.344 abc	A
217J	0.067 a C	0.302 a BC	0.620 a BC	1.027 a B	5.604 ab	A
256J	0.067 a C	0.285 a BC	0.552 a BC	1.037 a B	3.990 d	A
L201	0.067 a C	0.266 a C	0.644 a C	1.558 a B	5.133 abcd	A
Quilla 66304	0.000 a C	0.270 a C	0.508 a BC	1.193 a B	5.336 abc	A
CT6748-8CA-17P	0.000 a C	0.260 a C	0.449 a C	1.778 a B	4.460 bcd	A

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%

O IVG foi altamente correlacionado com o CC quando avaliados na mesma temperatura (Tabela 4.11) e a correlação aumentou com o decréscimo da temperatura. Para as temperaturas de 11°C, 13°C e 15°C, o mesmo padrão de correlação foi observado entre IVG e CR, mas com valores inferiores do que os observados para a correlação entre IVG e CC. A correlação entre os IVG de uma temperatura para outra foi significativa entre as combinações de 11°C, 13°C e 15°C. Adicionalmente, o IVG a 15°C foi significativamente correlacionado com o IVG a 17°C, e o IVG a 28°C não foi correlacionado com IVG em outras temperaturas. A correlação do CC de uma temperatura para outra foi alta e significativa somente entre os valores apresentados a 17°C e 28°C, enquanto que os CR entre diferentes temperaturas não foram correlacionados. Os CC e CR foram correlacionados em todas as temperaturas causando estresse por frio. Na temperatura ótima, eles não foram correlacionados.

Tabela 4.11 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as características Índice de velocidade de germinação (IVG), Comprimento do coleóptilo (CC) e Comprimento da radícula (CR) avaliadas nas temperaturas de 11°C, 13°C, 15°C, 17°C e 28°C em 17 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio

Temperatura		11°C			13°C			15°C			17°C			28°C		
Característica		IVG	CC	CR	IVG	CC	CR	IVG	CC	CR	IVG	CC	CR	IVG	CC	CR
11°C	IVG	1	0,85**	0,57**	0,56*	0,19	0,24	0,57**	0,36	0,53*	0,39	0,27	0,30	0,11	0,24	0,17
	CC		1	0,44*	0,63**	0,30	0,21	0,65**	0,38	0,39	0,41	0,27	0,37	0,25	0,44	0,15
	CR			1	0,11	-0,09	0,26	0,11	0,14	0,35	0,08	-0,16	-0,02	0,07	-0,26	0,14
13°C	IVG				1	0,77**	0,53**	0,52**	0,15	0,27	0,43	0,56*	0,66**	0,08	0,60**	0,18
	CC					1	0,46*	0,40	0,20	0,25	0,25	0,27	0,43	-0,05	0,31	0,25
	CR						1	0,09	-0,11	0,36	0,18	0,09	0,25	-0,35	-0,01	0,18
15°C	IVG							1	0,69**	0,50*	0,59**	0,26	0,20	0,13	0,31	0,15
	CC								1	0,67**	0,44	-0,25	-0,28	0,04	-0,06	0,39
	CR									1	0,37	-0,05	-0,16	-0,23	-0,13	0,42
17°C	IVG										1	0,45*	0,40	0,33	0,45*	0,35
	CC											1	0,83**	0,27	0,74**	-0,05
	CR												1	0,36	0,64**	0,04
28°C	IVG													1	0,44	-0,12
	CC														1	-0,30
	CR															1

* e ** coeficiente de correlação de Pearson significativo a 5 e a 1% respectivamente.

A temperatura base, abaixo da qual a taxa de germinação é nula, foi calculada para cada genótipo através da análise de regressão linear do IVG em função da temperatura (Tabela 4.12). A temperatura base variou de 8,03°C para a testemunha L 201 a 11,58 °C para o acesso 325J - Gaisen Mochi 909, com média de 9,5°C para as testemunhas e de 10,5°C para os acessos. Entre os acessos, a menor temperatura base calculada foi para o acesso 320J - Nourin Mochi 2 (9,67°C), cuja temperatura base foi inferior a da testemunha CT6748-8CA-17P e similar a da QUILLA 66304. Outros treze acessos apresentaram temperatura base inferior à apresentada pela testemunha CT6748-8CA-17P. A média dos coeficientes de determinação das análises de regressão para todos os genótipos foi de 0,97.

Tabela 4.12 - Coeficientes da regressão linear do índice de velocidade de germinação e temperatura base para a germinação de dezessete acessos japoneses de arroz e de três testemunhas tolerantes ao frio

Genótipo	Coeficiente linear	Coeficiente angular	R ²	Temperatura base (°C)
312J	-4,142	0,397	0,96	10,45
400J	-4,351	0,401	0,96	10,85
294J	-3,598	0,339	0,97	10,61
74J	-4,741	0,425	0,99	11,16
278J	-4,141	0,387	0,97	10,70
279J	-3,322	0,336	0,96	9,89
386J	-4,361	0,425	0,98	10,25
415J	-4,067	0,369	0,98	11,03
325J	-4,547	0,393	0,96	11,58
310J	-3,944	0,384	0,93	10,26
122J	-4,308	0,416	0,98	10,36
24J	-3,677	0,370	0,96	9,93
407J	-4,846	0,423	0,97	11,45
402J	-3,718	0,371	0,98	10,03
320J	-3,235	0,334	0,96	9,67
217J	-3,662	0,370	0,97	9,89
256J	-4,121	0,395	0,97	10,44
L201	-2,798	0,348	0,96	8,03
Quilla 66304	-3,867	0,400	0,99	9,68
CT6748-8CA-17P	-4,793	0,440	0,98	10,89

4.3.3 Experimento III: Tolerância ao frio na fase de germinação-emergência e desenvolvimento inicial

No experimento conduzido em areia para simular condições de germinação no solo e avaliar o desenvolvimento inicial sob estresse por frio, foi detectada diferença significativa entre genótipos para as quatro características avaliadas (Tabela 4.13). Entre acessos houve diferença para AP e MS, enquanto que entre as testemunhas houve diferenças para IE e CR. E para as médias de acessos e testemunhas, houve diferença para IE e AP.

Tabela 4.13 - Resumo da análise de variância para índice de Emergência (IE), Altura da plântula (AP), Comprimento da raiz (CR) e produção de matéria seca (MS) avaliadas em 17 acessos japoneses de arroz e três testemunhas tolerantes ao frio

FV	GL	QM			
		IE	AP	CR	MS
Blocos	3	1,585	1,521	2,978	302,104
Genótipos (G)	19	0,3858**	1,79**	0,483*	130,190**
Acessos (A)	16	0,209 ^{ns}	0,568*	0,362 ^{ns}	130,591**
Testemunhas (T)	2	1,068**	0,604 ^{ns}	1,487**	161,358 ^{ns}
A vs T	1	1,841**	23,71**	0,414 ^{ns}	61,446 ^{ns}
Resíduo	57	0,122	0,246	0,262	53,707
CV(%)		13,18	9,11	12,73	31,82
Média G		7,235	5,44	4,02	23,03
Média A		6,821	5,209	4,049	22,661
Média T		9,583	6,733	3,848	25,115

*, **: Significativo a 5 e a 1% pelo teste F, respectivamente e ^{ns}: não significativo

A comparação das médias dos 20 genótipos pelo teste de Tukey permitiu identificar que, para IE, a diferença entre genótipos e também entre testemunhas detectada na análise de variância é devida ao melhor desempenho da testemunha L 201 em relação a testemunha QUILLA 66304 e a dez acessos. Outras combinações de testemunhas e todos os acessos não apresentaram diferença entre si (Figura 4.8).

Figura 4.8 - Médias de acessos japoneses de arroz e de testemunhas tolerantes ao frio para índice de emergência. Letras diferentes indicam que há diferença significativa segundo o teste de Tukey a 5%

Para AP, as três testemunhas apresentaram as maiores médias (Figura 4.9), não sendo significativamente diferentes dos acessos 320J - Nourin Mochi 2 e 122J - Chiyoda Wase, embora estes acessos não tenham diferido dos demais acessos. Diferentemente da análise de variância, que indicou a ocorrência de diferença entre acessos, o teste de médias não detectou diferenças.

Figura 4.9 - Médias de acessos japoneses de arroz e de testemunhas tolerantes para Altura da plântula (cm) avaliada após 28 dias em temperatura de 15°C. Letras diferentes indicam que há diferença significativa segundo o teste de Tukey a 5%

Para comprimento de raiz, o teste de comparação de médias não detectou diferenças entre genótipos, embora a análise de variância tenha detectado diferença.

Considerando-se as médias para massa de matéria seca (Figura 4.10), a testemunha CT6748-8CA-17P e o acesso 320J - Nourin Mochi 2 diferiram do acesso 279J - Ootama, enquanto que os demais acessos e testemunhas não diferiram em relação a outros genótipos. A diferença entre acessos detectada na análise de variância é devida ao maior acúmulo de matéria seca do acesso 320J - Nourin Mochi 2 em relação ao acesso 279J - Ootama.

Figura 4.10 - Médias de acessos japoneses de arroz e de testemunhas tolerantes ao frio para Produção de matéria seca (mg) por parcela avaliada após 28 dias em temperatura de 15°C. Letras diferentes indicam que há diferença significativa segundo o teste de Tukey a 5%

4.4 Discussão

Variabilidade e desempenho de acessos e testemunhas tolerantes sob estresse por frio de 13°C

A germinação uniforme e o rápido desenvolvimento de plântulas são fundamentais para o crescimento vegetativo, uniformidade de maturação, e

produtividade do arroz. A ocorrência de baixas temperaturas afeta a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas (YOSHIDA, 1981), o que leva a consideráveis perdas. A utilização de cultivares tolerantes ao frio na germinação é apontada como a melhor alternativa para evitar esses prejuízos.

O primeiro passo para a obtenção de cultivares tolerantes é a identificação de fontes de tolerância em bancos de germoplasma (MIURA et al., 2001). Entre os acessos japoneses observou-se variabilidade para características avaliadas de tolerância ao frio na germinação (Tabela 4.1) e na análise de componentes principais, encontraram-se acessos com bom desempenho para o conjunto de características avaliadas (Figura 4.7). O desempenho dos acessos identificados como tolerantes ao frio é similar a das testemunhas tolerantes quando consideradas as características de redução do CC e CR devido ao estresse por frio (Figura 4.6). Embora, em média, testemunhas apresentaram maiores valores do que os acessos para CC e CR, e menores para RC e RR (Tabela 4.1), houve variabilidade entre os acessos, sendo encontrados acessos cujos comprimentos e reduções foram estatisticamente iguais aos das testemunhas (Figuras 4.4, 4.5 e 4.6). O acesso 413J - Chousen destacou-se por apresentar o pior desempenho para tolerância ao frio (Tabela 4.1). Esse acesso, em análises com marcadores moleculares SSR, apresentou maior proximidade ao grupo varietal Indica do que ao grupo Japônica pela análise com marcadores moleculares (BOSETTI et al.¹ (em fase de elaboração)). Os resultados de Glazsman; Kaw e Khush (1990) enfatizam que a tolerância ao frio é uma das principais características para a classificação de arroz nos grupos varietais Indica e Japônica. Variedades Japônica são geralmente mais tolerantes ao frio do que as Indica, entretanto, há variação mesmo entre cultivares Japônica (SAITO et al., 2004) e entre cultivares Indica (CRUZ; MILACH, 2004).

Embora os maiores valores para CC a 13°C tenham sido observados para as três testemunhas, os menores valores para RC foram observados para alguns acessos japoneses, pois em estudos de tolerância ao frio é difícil distinguir os efeitos da baixa temperatura dos efeitos do vigor. A germinação, o desenvolvimento e o crescimento de plântulas sob estresse são funções do vigor e da tolerância ao estresse. Estudando o controle genético da tolerância salina em trigo e cevada,

¹ BOSETTI, F.; MATA, T.L.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B. **Genetic diversity in Japanese rice germplasm using SSR markers.**

Foster et al. (1990) propuseram que genes que contribuem para o vigor podem ser diferentes de genes que contribuem para a tolerância, o que foi também sugerido por Foolad e Lin (2001) na análise genética da tolerância ao frio durante o crescimento vegetativo em tomate (*Lycopersicon esculentum*).

A avaliação da germinação em mais de uma temperatura é necessária para distinguir a tolerância ao frio das características relacionadas ao vigor (MASSARDO et al., 2000). Na avaliação da tolerância ao frio na germinação em arroz foi proposta a comparação do crescimento sob baixa temperatura em relação à temperatura ótima de germinação para a cultura. A porcentagem de redução do comprimento do coleóptilo devido ao frio foi a característica que permitiu separação precisa e correta de genótipos previamente conhecidos como tolerantes e suscetíveis ao frio (CRUZ; MILACH, 2004), representando uma característica robusta quanto a resposta dos genótipos.

A correlação observada entre RC e CC a 13°C e entre RR e CR a 13°C foram negativas e altas (Tabela 4.3), indicando que genótipos com maior crescimento a 13°C também tendem a ter menores valores para redução, pois a redução é calculada considerando-se essa medida em relação a medida obtida para germinação em temperatura ótima. No entanto, genótipos com maiores CC a 13°C e menor RC não foram os mesmos. Isso pode ser devido ao fato de que, além da tolerância ao frio, diferenças de vigor entre genótipos afetam o comprimento do coleóptilo (MASSARDO et al., 2000). Assim, o desempenho a 13°C pode não ser devido somente à tolerância ao frio dos genótipos em si. Por isso alguns autores consideram importante a avaliação em diferentes temperaturas para tentar diminuir os efeitos de vigor e considerar apenas os efeitos de tolerância ao frio (MASSARDO et al., 2000; CRUZ; MILACH, 2004). Embora a correlação entre os comprimentos do coleóptilo e da radícula a 13°C tenha sido significativa com os comprimentos a 28°C, indicando que em geral, genótipos com maior vigor na germinação em temperatura ideal acabam apresentando maior vigor quando em temperaturas mais baixas, os valores são baixos, indicando que há também um comportamento diferencial dos genótipos quanto ao crescimento de parte aérea e de radícula nas duas temperaturas. Isto é um indício de que há maior tolerância ao frio em alguns genótipos que, embora não apresentem grande crescimento de coleóptilo a 28°C em

relação a outros genótipos, acabam sofrendo menos o efeito da baixa temperatura de tal forma que a redução do CC não é tão acentuada.

A herdabilidade das características avaliadas sob condição de estresse por frio foi menor do que a encontrada para as mesmas características sob temperatura ótima (Tabela 4.2). A baixa herdabilidade observada pode ser explicada pelo controle poligênico das respostas na germinação sob baixa temperatura, conforme sugerido por estudos da herança da tolerância ao frio (SASAKI et al., 1973 apud STHAPIT; WITCOMBE, 1998; CRUZ et al., 2006, SHARIFI, 2008), e como suportado por estudos envolvendo a análise de mapeamento de QTLs para germinação em baixa temperatura (MIURA et al., 2001; FUJINO et al., 2004) e tolerância ao frio nos primeiros estágios de desenvolvimento da cultura (BARUAH et al., 2009; ZHANG et al., 2005a).

A razão CVg/CVe demonstrou situação favorável para a seleção (valor maior que 1) apenas para comprimento do coleóptilo a 28°C, evidenciando as dificuldades envolvidas na seleção de características de tolerância ao frio sob baixas temperaturas. Entre as características avaliadas para identificar a reação dos genótipos em baixas temperaturas, os maiores valores para a razão CVg/CVe e herdabilidade foram observados para redução no comprimento do coleóptilo, indicando que esta é a mais confiável para identificar genótipos de arroz tolerantes ao frio na germinação. Cruz e Milach (2004) observaram também que a redução no comprimento do coleóptilo permite a precisa identificação de genótipos tolerantes e suscetíveis ao frio.

Nas condições de campo, o bom desempenho de genótipos em baixa temperatura é dependente da tolerância ao frio e de alto vigor, o que permite o estabelecimento de plântulas de forma rápida e homogênea. Como redução no comprimento do coleóptilo é a característica que permite a identificação de genótipos tolerantes ao frio (CRUZ; MILACH, 2004) e diferenças de genótipos no comprimento do coleóptilo são correlacionadas com o estabelecimento de plântulas sob baixa temperatura (OGIWARA; TERASHIMA, 2001, MIURA et al., 2004), a análise de componentes principais foi utilizada como uma abordagem multivariada para analisar o desempenho dos genótipos quanto a tolerância ao frio, considerando

simultaneamente os comprimentos de coleóptilo e radícula sob estresse e as reduções em relação a temperatura ótima devido ao frio.

A análise de componentes principais permitiu resumir as informações obtidas para quatro características relacionadas com a tolerância ao frio em um componente principal (Tabela 4.4), responsável pela detecção de genótipos apresentando simultaneamente tolerância ao frio identificada pelas baixas reduções no comprimento da parte aérea e da radícula, e por maior crescimento da parte aérea e da radícula a 13°C. Dessa forma, acessos com valores extremos para o escore desse primeiro componente principal abrangem a combinação de características interessantes agronomicamente, sendo capazes de tolerar baixas temperaturas, e ao mesmo tempo, apresentar alto vigor para o rápido estabelecimento de plantas e uniformidade da lavoura. A análise dos escores dos genótipos para o primeiro componente principal permitiu a identificação de 50 acessos com valores intermediários entre as testemunhas QUILLA 66304 e CT6748-8CA-17P que apresentaram os menores valores, e conseqüentemente, maior tolerância, e a testemunha L 201 que apresentou os maiores valores entre as testemunhas. Esses acessos que apresentam menores reduções nos comprimentos de coleóptilo e radícula devido ao frio e maiores comprimentos sob baixa temperatura são os acessos que apresentam simultaneamente maior vigor e tolerância ao frio.

Relação entre acessos e testemunhas tolerantes em diferentes temperaturas

A ocorrência de baixas temperaturas afeta a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial de plântulas de arroz (YOSHIDA, 1981). A temperatura teve efeito significativo para as características IVG, CC e CR avaliadas no experimento II (Tabela 4.5), reduzindo-se o desempenho dos genótipos com o decréscimo da temperatura (Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10). Adicionalmente, a análise de regressão linear demonstrou que o IVG aumentou linearmente com o aumento da temperatura de 11°C a 28°C (Tabela 4.12), corroborando com os resultados de Steinmaus; Prather e Holt (2009) estudando a germinação em nove espécies de plantas daninhas e de Ali; Naylor e Matthews (2003) estudando cultivares de arroz. A análise de regressão também permite a estimativa da temperatura base para cada genótipo, abaixo da qual a taxa de germinação é nula, calculando-se o intercepto no eixo x da regressão

linear (GUMMERSON, 1986; STEINMAUS; PRATHER; HOLT, 2000). Os acessos japoneses apresentaram temperatura base média de 10,5°C e as testemunhas tolerantes ao frio, média de 9,5°C. Embora tenha sido detectada essa diferença média de 1°C entre acessos e testemunhas, treze acessos apresentaram temperatura base menor do que a da testemunha CT6748-8CA-17P, indicando capacidade para germinar em baixa temperatura equiparável com a de testemunhas consideradas tolerantes ao frio. Os dezessete acessos japoneses apresentaram temperatura base para germinação inferior à observada por Ali, Naylor e Matthews (2003) em cultivares de Bangladesh (média de 13,1°C).

A interação genótipo por temperatura foi significativa para índice velocidade de germinação e comprimento do coleóptilo (Tabela 4.5). Sharifi e Aminpanah (2010) relataram interação significativa para comprimento de radícula além de comprimento do coleóptilo e taxa de germinação. Zhang et al. (2005b) também detectaram interação genótipo por temperatura para comprimento do coleóptilo quando comparando QTLs para vigor em diferentes temperaturas, e observaram que a interação parece ser QTL específica.

Na análise considerando-se o desempenho dos genótipos em cada temperatura, foram detectadas diferenças significativas entre genótipos a 13°C, 15°C, 17°C e 28°C para IVG, e a 17°C e 28°C para CC e CR (Tabelas 4.6, 4.8, 4.9 e 4.10). A ausência de diferenças a 13°C e a 15°C para CC e CR, e a ocorrência de diferenças a 17°C e 28°C podem ser explicadas pelo fato de que os acessos utilizados no experimento II foram selecionados com base no seu desempenho a 13°C no experimento I, escolhendo-se acessos entre os que apresentaram maiores valores para CC e CR a 13°C e menores reduções de CC e CR devido ao frio. E como a interação entre genótipo e temperatura é significativa para a característica CC (Tabela 4.5), comportamento diferencial dos genótipos é observado em diferentes temperaturas, detectando-se diferenças a 17°C e 28°C. A baixa temperatura, ou outros estresses podem influenciar a expressão de genes de vigor e esses genes podem variar quanto a resposta ao estresse, o que é descrito como interação genótipo por ambiente (TANKSLEY, 1993). Desde que as interações genótipo por temperatura são QTL ou gene específicas, alguns genes mostrariam efeitos de vigor apenas sob condições ótimas, enquanto outros genes seriam ativos

em várias condições ou apenas sob condições de estresse (ZHANG et al., 2005b), explicando a detecção de diferenças entre acessos em algumas temperaturas mas não em outras.

Observou-se a tendência de diferenças entre genótipos aumentarem com o aumento da temperatura de 11 a 28°C, o que sugere que há diferenças entre genótipos para características de vigor e não apenas efeito de tolerância ao estresse por frio. Essa tendência observada corrobora com o relato de Zhang et al. (2005b) de que a diferença no vigor de plântula entre as cultivares Lemont e Teping é associada com a temperatura. A 25°C e a 20°C, as duas cultivares apresentaram diferença e o grau de diferença diminuiu a 15°C, sugerindo a presença de interação genótipo por temperatura para características de vigor em arroz (ZHANG et al., 2005b).

A diferença entre acessos para acúmulo de matéria seca detectada na análise de variância do experimento III (Tabela 4.13) é devida ao maior acúmulo de matéria seca do acesso 320J - Nourin Mochi 2 em relação ao acesso 279J - Ootama. A produção de matéria seca reflete a capacidade de transferência de matéria seca dos tecidos de reserva para o eixo embrionário e amostras que apresentam maior peso indicam genótipos com maior quantidade de plântulas que germinaram e emergiram do solo e com maior capacidade de transferência (TORRES TORO, 2006), o que implica em maior comprimento de coleóptilo. De fato, enquanto a testemunha CT6748-8CA-17P e o acesso 320J - Nourin Mochi 2 destacaram-se entre genótipos com melhores desempenhos para IE (Figura 4.8) e AP (Figura 4.9), o acesso 279J - Ootama esteve nos grupos com piores desempenhos para as duas características.

Embora os acessos japoneses apresentem capacidade de tolerar o estresse por frio apresentando reduções nos comprimentos de coleóptilo e radícula devido ao frio comparáveis com as de testemunhas tolerantes, os comprimentos de coleóptilo foram menores do que o das testemunhas, inclusive em temperatura ótima, sugerindo um baixo vigor nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Referências

ALI, M.G.; NAYLOR, R.E.L.; MATTHEWS, S. Effect of a range of constant temperatures on germination of fifteen Bangladeshi rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Islamabad, v. 6, p. 1070-1076, 2003.

ANDAYA, V.C.; MACKILL, D. J. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 2579-2585, 2003.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.

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

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: versão windows. Viçosa: Editora UFV, 2001. 642 p.

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

_____. Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2004.

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

FARRELL, T.C.; FOX, K.M.; WILLIAMS, R.L.; FUKAI, S. Genotypic variation for cold tolerance during reproductive development in rice: screening with cold air and cold water. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 98, p. 178-194, 2006.

FOOLAD, M.R.; LIN, G.Y. Genetic analysis of cold tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Euphytica**, Wageningen, v. 122, p. 105-111, 2001.

FORSTER, B.P.; PHILLIPS, M.S.; MILLER, T.E.; BAIRD, E.; POWELL, W. Chromosome location of genes controlling tolerance to salt (NaCl) and vigour in *Hordeum vulgare* and *H. chilense*. **Heredity**, London, v. 65, p. 99-107, 1990.

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

GLASZMANN, J.C.; KAW, R.N.; KHUSH, G.S. Genetic divergence among cold tolerant rices (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 45, p. 95, 104, 1990.

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

LI, C.C.; RUTGERS, J.N. Inheritance of cool-temperature seedling vigor in rice and its relationship with other agronomic characters. **Crop Science**, Madison, v. 20, p. 295-298, 1980.

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

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MASSARDO, F.; CORCUERA, L.; ALBERDI, M. Embryo physiological responses to cold by two cultivars of oat during germination. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1694-1701, 2000.

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

MIURA, K.; LIN, S.Y.; ARAKI, H.; NAGAMINE, T.; KUROKI, M.; SHIMIZU, H.; ANDO, I.; YANO, M. Genetical studies on germination of seed and seedling establishment for breeding of improved rice varieties suitable for direct seeding culture. **JARQ: Japan Agricultural Research Quarterly**, Tokyo, v. 38, p. 1-5, 2004.

OGIWARA, H.; TERASHIMA, K. A varietal difference in coleoptile growth is correlated with seedling establishment of direct seeded Rice in submerged Field under low temperature conditions. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 4, p. 166-172, 2001.

SAITO, K.; HAYANO-SAITO, Y.; MARUYAMA-FUNATSUKI, W.; SATO, Y.; KATO, A. Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus Ctb1 for cold tolerance at the booting stage of rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 190, p. 515-522, 2004.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide v.8.2. Cary, 2001. 1028 p.

SHARIFI, P. Inheritance of cold tolerance in rice at the germination stage. **Asian Journal of Plant Science**, Faisalabad, v. 7, p. 485-489, 2008.

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

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

STEINMAUS, S.J.; PRATHER, T.S.; HOLT, J.S. Estimation of base temperatures for nine weed species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 275-286, 2000.

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

TAKAHASHI, N. Inheritance of seed germination and dormancy. In: MATSUO, T.; FUSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. **The science of the rice plant**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v. 3, chap. 3, p. 348-359.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, p. 205-233, 1993.

TORRES TORO, E. A. **Avaliação de linhagens de arroz (*Oryza sativa* L.) suscetíveis e tolerantes a baixas temperaturas em cruzamentos dialélicos parciais**. 2006.143 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

YOSHIDA, S. Climatic environment and its influence. In: _____. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: The International Rice Research Institute, 1981. chap. 2, p. 65-110.

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

ZHANG, Z.H.; QU, X.S.; WAN, S.; CHEN, L.H.; ZHU, Y.G. Comparison of QTL controlling seedling vigour under different temperature conditions using recombinant inbred lines in rice (*Oryza sativa*). **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 423-429, 2005b.

5 OBTENÇÃO DE UMA COLEÇÃO NUCLEAR DE ACESSOS JAPONESES DE ARROZ

Resumo

A obtenção de coleções nucleares é um eficiente meio para a caracterização detalhada, exploração e uso de recursos genéticos armazenados em bancos de germoplasma. Uma coleção nuclear de 52 acessos de arroz de origem japonesa foi obtida a partir de uma coleção de 192 acessos pertencente ao Banco de Germoplasma de arroz do Departamento de Genética da ESALQ/USP. A coleção nuclear foi obtida com o programa PowerCore e com base em 22 características fenotípicas (treze variáveis contínuas e nove categóricas) e 24 marcadores moleculares microssatélites. Todas as classes fenotípicas e os 181 alelos detectados pelos marcadores moleculares na coleção inteira foram amostrados na coleção nuclear. A coleção nuclear teve diferença de média (MD%) de 2,85%, diferença de variância (VD%) de 28,26%, taxa variável (VR%) de 116,54% e taxa de coincidência (CR%) de 95,08% em relação a coleção inteira, indicando cobertura completa das variáveis contínuas. As correlações entre os índices de diversidade de Shannon Weaver e de Nei para os marcadores moleculares e variáveis categóricas, e as distribuições de frequências alélicas e das classes fenotípicas entre a coleção inteira e nuclear foram significativamente altas ($r > 0,92$), indicando que a coleção nuclear obtida foi altamente representativa da coleção inteira.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; Diversidade genética; Coleção nuclear; Caracterização fenotípica; Caracterização molecular

Abstract

Development of core collections is an effective mean to detailed characterization, exploration and use of genetic resources held in large germplasm collections. A core collection containing 52 accessions was developed from a germplasm collection of 192 Japanese rice accessions maintained at the Rice Germplasm Bank of Genetics Department at ESALQ/USP. The core collection was developed with PowerCore software on the basis of 24 microsatellite marks and 22 phenotypic traits (thirteen continuous and nine categorical variables). The 181 alleles detected by the molecular markers and all phenotypic classes of the entire collection were represented in the core collection. The resultant core collection had 2,85% of mean difference (MD%), 28,26% of variance difference (VD%), 116,54% of variable rate (VR%), and 95,08% of coincidence rate (CR%) with the entire collection, which brought about full coverage of continuous traits. The correlation coefficients between core and entire collections for Shannon Weaver and Nei diversity index, distribution frequency for categorical variables and allele frequency were greater than 0,92, indicating that the core collection was representative of the entire collection.

Keywords: *Oryza sativa*; Genetic diversity; Core collection; Phenotypic characterization; Molecular characterization

5.1 Introdução

Bancos de germoplasma existem para conservar a diversidade genética de plantas cultivadas e selvagens. Essa diversidade é essencial para incrementos na produtividade agrícola, sustentabilidade e qualidade nutricional de plantas cultivadas frente a mudanças climáticas, pragas e preferências do consumidor. É estimado que mais de sete milhões de acessos de várias espécies são conservados em bancos de germoplasma no mundo (FAO, 2010).

Com o rápido aumento no número de acessos em coleções de germoplasma, muitos bancos enfrentam problemas de redundância e custos para manter essas coleções, o que pode ser um obstáculo para a sua exploração, avaliação e utilização (HOLDEN, 1984). Para lidar com esse tipo de problemas, Frankel e Brown (1984) propuseram o conceito de coleção nuclear. Coleção nuclear (*core collections* ou *core sets*) é uma subamostra de uma coleção de germoplasma, que contém com o mínimo de redundância, o máximo possível da diversidade genética presente na coleção inteira (FRANKEL; BROWN 1984; FRANKEL, 1984). As coleções nucleares foram introduzidas no manejo de recursos genéticos vegetais com o principal objetivo de ampliar e sistematizar o uso desses recursos (CORDEIRO; ABADIE, 2007) e o seu estabelecimento é necessário para assegurar o acesso a genes que contribuem para características de interesse e que são conservados em bancos de germoplasma em vários lugares do mundo, aumentando o potencial de uso dessas coleções (BROWN, 1989; UPADHYAYA et al., 2006). As coleções nucleares são um eficiente meio para a caracterização, exploração e uso intensivo de recursos genéticos armazenados em bancos de germoplasma bem como para monitorar a deriva genética durante a manutenção e identificar lacunas na diversidade genética para o manejo dos bancos (BROWN, 1989).

A caracterização fenotípica requer extensivo investimento de recursos, especialmente para características de herança complexa, de tolerância a estresses bióticos e abióticos e a caracterização genotípica com um grande número de marcadores também é cara. Entretanto, informações fenotípicas e genotípicas são absolutamente necessárias para mapeamento associativo de características controladas por muitos genes e análise dos marcadores ligados a elas (AGRAMA et

al., 2007; JIN et al., 2010). O desenvolvimento de coleções nucleares para a redução do número de acessos é uma estratégia efetiva para obtenção de informações com custo razoável (AGRAMA et al., 2009).

Verifica-se que coleções nucleares foram desenvolvidas em arroz, podendo-se citar a da EMBRAPA (ABADIE et al., 2005) e do USDA (YAN et al., 2007), obtidas a partir de amostragem estratificada. A coleção de germoplasma de arroz da Embrapa consiste de aproximadamente 10.000 acessos e a coleção nuclear foi formada por 550 acessos, classificados em três estratos: variedades tradicionais do Brasil, linhagens/cultivares melhoradas do Brasil e linhagens/cultivares introduzidas (ABADIE et al., 2005). A caracterização e avaliação fenotípica desta coleção nuclear foram realizadas em experimentos conduzidos em vários ambientes (CORDEIRO; ABADIE, 2007; BRONDANI et al., 2006) e uma *mini core* de 24 acessos foi obtida, dentre as 242 linhagens e cultivares brasileiras e introduzidas da coleção nuclear com base na divergência dos acessos identificada a partir de dados de marcadores SSRs (BORBA et al., 2009).

A coleção completa de arroz do USDA é constituída por 18.412 acessos, e a coleção nuclear desenvolvida contém 1790 acessos (YAN et al., 2007). A partir da coleção nuclear, uma *mini-core subset* de 217 acessos foi obtida utilizando 26 características fenotípicas e 70 marcadores moleculares (AGRAMA et al., 2009), e a caracterização fenotípica e genotípica dessa *mini-core* foi relatada por Li et al. (2010).

Desde que o conceito de coleção nuclear foi proposto, discussões no desenvolvimento de coleções têm aumentado, envolvendo diferentes aspectos como estratégias de amostragem, tamanho e representatividade da coleção (ZEULI; QUALSET, 1993; HU; ZHU; XU, 2000; KIM et al., 2007). Vários métodos que maximizem a diversidade contida na coleção inteira bem como a distância genética entre os acessos têm sido propostos para a obtenção de coleções nucleares. Métodos de amostragem estratificada têm sido aplicados com sucesso no desenvolvimento de várias coleções nucleares (HU; ZHU; XU, 2000; FRANCO et al., 2006; ABADIE et al., 2005; YAN et al., 2007). Essa abordagem utiliza métodos de agrupamento primeiramente com base em dados de origem, passaporte e distância

genética (JANSEN; van HINTUM, 2007), seguida pela alocação de genótipos de cada grupo para a formação da coleção nuclear.

Quando da utilização de marcadores moleculares para obter a coleção nuclear, na retenção da diversidade genética, métodos baseados na estratégia M (maximização) ou combinação de métodos (BATAILLON et al., 1996; MARITA et al., 2002) são utilizados para selecionar combinações específicas de acessos ao mesmo tempo que maximiza o número de alelos em cada loco. A diversidade alélica de uma coleção nuclear formada pela estratégia M é definida em termos do número de classes de alelos representadas na amostra. Usando a estratégia *advanced M*, Kim et al. (2007) apresentaram o software PowerCore que possui a capacidade de representar todos os alelos identificados pelos marcadores moleculares e todas as classes de observações fenotípicas no desenvolvimento de coleções nucleares. Esse programa seleciona os acessos que irão compor a coleção nuclear pela estratégia M implementada através de um algoritmo heurístico modificado. Até o momento, a estratégia M é relatada como sendo a mais poderosa função para a seleção de acessos para a coleção nuclear com o mais diverso grupo de alelos e eliminando a redundância que vem de alelos não informativos (FRANCO et al., 2006), sendo que a eficiência de amostragem implementando-se o algoritmo heurístico é maior do que utilizando as estratégias de amostragem estratificada aleatória e amostragem aleatória (CHUNG et al., 2009; ZHAO et al., 2010). Usando simulação computacional, Bataillon et al. (1996) observaram que a estratégia M também é mais efetiva na retenção de alelos neutros amplamente distribuídos e de baixa frequência do que outras estratégias de amostragem.

O programa PowerCore foi utilizado em relatos recentes na seleção dos 217 acessos da *mini-core subset* do *USDA Rice genebank* (AGRAMA et al., 2009), no desenvolvimento de coleções nucleares de acessos de arroz mantidos no *RDA-genebank* na República da Coréia (ZHAO et al., 2010), de *Solanum pimpinellifolium* (RAO et al., 2011) e de *Vigna radiata* (MOE et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi obter uma coleção nuclear de acessos japoneses pertencentes ao Banco de Germoplasma de arroz do Departamento de Genética da ESALQ/USP a partir de informações de marcadores moleculares, variáveis

categóricas e variáveis contínuas para as quais os acessos foram previamente caracterizados e avaliados.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Dados fenotípicos e moleculares usados na obtenção da coleção nuclear

Dados de 22 descritores fenotípicos (13 variáveis contínuas e nove variáveis categóricas) e 24 marcadores microssatélites de 192 acessos japoneses de arroz do Banco de Germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ/USP (ANEXO A) foram usados para obtenção de uma coleção nuclear. As características fenotípicas avaliadas foram: Pubescência do limbo (PL), ângulo de inserção da folha bandeira (IFB), tipo da panícula (TP), ramificações secundárias da panícula (RS), posição das ramificações da panícula (PR), posição do eixo principal da panícula (PEP), presença e comprimento da arista (PCA), cor da arista na floração (CARF), cor do ápulo (CAPF), número de dias para o florescimento (NDF), número de perfilhos (NP), comprimento do colmo (CC), altura da planta na maturidade (APM), comprimento da panícula (CP), comprimento da folha bandeira (CFB), largura da folha bandeira (LFB), número de dias para a maturidade (NDM), produtividade de grãos (PG), massa de cem sementes (MCS), comprimento do grão (CG), largura do grão (LG) e relação comprimento e largura do grão (CG/LG).

A avaliação de características fenotípicas está descrita no capítulo 2 e a caracterização molecular no capítulo 3 desta tese.

5.2.2 Obtenção e representatividade da coleção nuclear

A amostragem da coleção nuclear foi feita no programa PowerCore descrito por Kim et al. (2007) no qual a estratégia M é implementada através de um algoritmo heurístico modificado para maximizar o número de alelos detectados por marcadores moleculares e o número de classes fenotípicas. Para as variáveis categóricas, cada classe foi considerada e para as variáveis contínuas foi definido

um intervalo para separar a amplitude das medidas e estabelecer classes para as 13 variáveis contínuas. Essas variáveis foram automaticamente classificadas em diferentes classes pelo PowerCore baseado na regra de Sturges = $1 + \log_2(n)$, onde n é o número de acessos.

Os índices de diversidade de Shannon Weaver e de Nei foram estimados para cada variável categórica e cada marcador molecular na coleção original e na coleção nuclear pelo programa PowerCore e o PIC para os marcadores moleculares foi estimado no PowerMarker (LIU; MUSE, 2005). A coleção nuclear resultante foi comparada com a coleção original para avaliar a sua representatividade. Correlações entre a coleção inteira e a coleção nuclear foram estimadas para os índices de diversidade e para as distribuições de frequências das classes das características fenotípicas e dos alelos identificados pelos marcadores SSRs.

Para as 13 variáveis contínuas, a homogeneidade entre a coleção nuclear e a coleção inteira foi avaliada usando o teste de Newman-Keuls para médias e o teste de Levene para variâncias. Foram obtidas a diferença de médias (*mean difference percentage* - MD%), diferença de variâncias (*variance difference percentage* - VD%), taxa de coincidência para a amplitude (*coincidence rate* (CR%) *for range*) e taxa variável para o coeficiente de variação (*variable rate* (VR%) *for the coefficient of variation*) conforme Hu, Zu e Xu (2000) e implementados no programa PowerCore (KIM et al., 2007), sendo:

- Diferença de médias:

$$MD(\%) = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \frac{|Me - Mc|}{Mc} \times 100$$

Em que

MD: diferença de médias entre a coleção nuclear e a coleção inteira;

Me: média da coleção inteira para a característica j ;

Mc: média da coleção nuclear para a característica j ;

m : número de características;

- Diferença de variâncias:

$$VD(\%) = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \frac{|V_e - V_c|}{V_c} \times 100$$

Em que

VD(%): diferença de variâncias;

V_e : variância da coleção inteira para a característica j ;

V_c : variância da coleção nuclear para a característica j ;

m : número de características;

- Taxa de coincidência:

$$CR(\%) = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \frac{R_c}{R_e} \times 100$$

Em que

CR(%): taxa de coincidência;

R_c : Amplitude da coleção nuclear para a característica j ;

R_e : Amplitude da coleção inteira para a característica j ;

m : número de características;

- Taxa variável:

$$VR(\%) = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \frac{CV_c}{CV_e} \times 100$$

Em que

VR(%): taxa variável;

CV_c : coeficiente de variação da coleção nuclear para a característica j ;

CV_e : coeficiente de variação da coleção inteira para a característica j ;

m : número de características;

A distribuição da diversidade da coleção inteira abrangida na coleção nuclear foi visualizada pela representação espacial da diversidade para as características fenotípicas e para os marcadores SSRs. Para as variáveis categóricas, o complemento do índice de similaridade de Jaccard foi calculado entre os acessos e as distâncias projetadas em um plano bidimensional. Para as variáveis contínuas, os escores das duas primeiras variáveis canônicas obtidos para cada acesso foram

representados no plano, e para os marcadores moleculares, as duas primeiras coordenadas principais baseadas no complemento da distância de Rogers-W foram projetadas.

5.3 Resultados

5.3.1 Coleção nuclear

Com base em 22 descritores fenotípicos e 24 marcadores microssatélites, 52 (27,1%) dos 192 acessos japoneses da coleção de germoplasma de arroz da ESALQ/USP foram alocados na coleção nuclear (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Coleção nuclear contendo 52 acessos japoneses do Banco de Germoplasma de arroz do Departamento de Genética da ESALQ/USP obtida com a estratégia PowerCore a partir da coleção de 192 acessos

Código do acesso	Nome	Código do acesso	Nome
003J	Fukuton	203J	Horarin
006J	Ezo Wase	205J	Matsuyama
036J	Nakaahara Mochi	209J	Kangyouho
045J	Mitsukasane	219J	Gaisen (4x)
050J	Wase Esoshima Mochi	239J	Col/Miyazaki/1963
070J	Kirishima	245J	Ishiwari Mochi
078J	Yonoyuki Mochi	248J	Col/Tokushima/1967
079J	Dango Mochi	250J	Jouon
099J	Eika Ine	257J	Hiderishirazu
110J	Mikuni No Homare	269J	Nourin Mochi 6
113J	Kyuushuu	273J	Shina Mochi
122J	Chiyoda Wase	274J	Nagae Wase
130J	Esojima	284J	Furuwase
133J	Nourin Mochi	289J	Shinhoku Daiou Mochi
136J	Nourin Mochi	290J	Riku Araki
139J	Nourin Mochi 1	311J	Shindai Okoshi
150J	Atoshirazu	367J	Bansei Tarou
170J	Tanaka Yakan	369J	Japão 7
172J	Oohataho	373J	Mogami Uruchi 1
173J	Nourin 11	374J	Gaisen
175J	Tomoe Mochi	380J	Japão 9
177J	Nourin 16	389J	Igisu Mochi
189J	Okabo	391J	Kurumi Wase 43
191J	Col/Fuzui/1965	393J	Hiderishirazu
197J	Toga	413J	Chousen
199J	Kahee	012.7J	Japão 10

5.3.2 Comparação de propriedades fenotípicas

Variáveis categóricas

Um total de 36 classes detectadas na coleção inteira para as nove variáveis categóricas avaliadas foram amostradas na coleção nuclear em proporções correspondentes às da coleção inteira. A distribuição de frequência das classes para as variáveis categóricas na coleção nuclear apresentou correlação de 0,98 ($p < 0,01$) com a distribuição da coleção inteira. A distribuição comparativa de frequência para as variáveis categóricas entre as duas coleções é apresentada na Figura 5.1.

Figura 5.1 - Distribuição de frequência (%) para: A) Pubescência do Limbo (1-Ausente, 2-Escassa, 3-Média, 4-Forte); B) Ângulo de inserção da folha bandeira (1-Ereto, 2-Intermediário, 3-Horizontal, 4-Descendente); C) Tipo da Panícula (1-Compacta, 2-Intermediária, 3-Aberta); D) Ramificações secundárias (1-Ausente e esparsas, 2-Densas, 3-Agrupadas); E) Posição das ramificações (1-Semi-ereto, 2-Intermediário, 3-Horizontal); F) Posição do eixo (1-Semi-vertical, 2-Ligeiramente curvado, 3-Curvado); G) Presença e comprimento da arista (1-Ausente, 2-Curta e parcialmente aristada, 3-Curta e completamente aristada, 4-Longa e parcialmente aristada, 5-Longa e completamente aristada); H) Cor da arista (1-Ausente 2-Palha, 3-Dourado, 4-Marrom, 5-Vermelho, 6-Púrpura, 7-Preto); I) Cor do ápulo (1-Branca/amarela, 2-Marrom, 3-Vermelha, 4-Púrpura, 5-Preta)

A coleção nuclear apresentou, para as variáveis categóricas, índice de diversidade de Shannon Weaver médio de 1,04, variando de 0,79 para PEP a 1,3 para CARF. O índice de diversidade de Nei médio foi de 0,58, variando de 0,45 para PEP a 0,65 para CARF. Na coleção inteira as médias para os índices de diversidade de Shannon Weaver e de Nei foram de 0,98 e 0,55, respectivamente. O índice de diversidade de Shannon Weaver variou de 0,69 (PEP) a 1,2 (CARF) e o índice de diversidade de Nei variou de 0,38 (PEP) a 0,65 (CARF) na coleção inteira (Figura 5.2). A correlação entre os índices de diversidade na coleção nuclear e na coleção inteira foi de 0,95 ($p < 0.01$) tanto para o índice de Shannon Weaver como para o de Nei.

Figura 5.2 - Distribuição dos índices de diversidade de Shannon Weaver e Nei para nove variáveis categóricas na coleção inteira e na coleção nuclear de acessos japoneses de arroz

Variáveis contínuas

Para cada uma das 13 variáveis contínuas foram definidas nove classes segundo a regra de Sturges implementada no PowerCore. A correlação entre as frequências de distribuição dos acessos nas classes de variáveis contínuas para a coleção nuclear e inteira foi de 0,92 ($p < 0,01$). A distribuição comparativa de frequência entre as duas coleções para as variáveis referentes às características da planta e produtividade é apresentada na Figura 5.3.

Figura 5.3 - Distribuição de frequência (%) comparativa entre as coleções inteira e nuclear para: A) Dias para o florescimento (classes: 1: 79-85; 2: 85-91; 3: 91-97; 4: 97-103; 5: 103-109; 6: 109-115; 7: 115-121; 8: 121-127; 9: 127-133; B) Dias para a maturidade (1: 109-114; 2: 114-120; 3: 120-125; 4: 125-131; 5: 131-136; 6: 136-142; 7: 142-147; 8: 147-153; 9: 153-158); C) Comprimento do colmo (1: 48-57; 2: 57-65; 3: 65-73; 4: 73-81; 5: 81-89; 6: 89-97; 7: 97-106; 8: 106-114; 9: 114-122); D) Altura de planta (1: 66-75; 2: 75-83; 3: 83-92; 4: 92-100; 5: 100-109; 6: 109-117; 7: 117-126; 8: 126-134; 9: 134-143); E) Comprimento da folha bandeira (1: 16-19; 2: 19-21; 3: 21-24; 4: 24-27; 5: 27-29; 6: 29-32; 7: 32-35; 8: 35-37; 9: 37-40); F) Largura da folha bandeira (1: 1,17-1,31; 2: 1,31-1,45; 3: 1,45-1,59; 4: 1,59-1,72; 5: 1,72-1,86; 6: 1,86-2,00; 7: 2,00-2,14; 8: 2,14-2,28; 9: 2,28-2,41); G) Comprimento da panícula (1: 16,5-17,7; 2: 17,7-18,9; 3: 18,9-20; 4: 20-21,2; 5: 21,2-22,4; 6: 22,4-23,5; 7: 23,5-24,7; 8: 24,7-25,8; 9: 25,8-27); H) Produtividade de grãos (1: 0,12-0,25; 2: 0,25-0,37; 3: 0,37-0,5; 4: 0,5-0,63; 5: 0,63-0,75; 6: 0,75-0,88; 7: 0,88-1,00; 8: 1,00-1,13; 9: 1,13-1,25)

Para as características de grão, a distribuição comparativa de frequência entre as duas coleções é apresentada na Figura 5.4.

Figura 5.4 - Distribuição de frequência (%) comparativa entre a coleção inteira e a coleção nuclear para: A) Comprimento do grão (classes: 1: 6,71-7,07; 2: 7,07-7,42; 3: 7,42-7,78; 4: 7,78-8,13; 5: 8,13-8,49; 6: 8,49-8,84; 7: 8,84-9,2; 8: 9,2-9,56; 9: 9,56-9,91); B) Largura do grão (1: 2,5-2,65; 2: 2,65-2,81; 3: 2,81-2,96; 4: 2,96-3,12; 5: 3,12-3,27; 6: 3,27-3,43; 7: 3,43-3,58; 8: 3,58-3,74; 9: 3,74-3,89); C) Relação comprimento e largura do grão (1: 1,88-2,1; 2: 2,1-2,32; 3: 2,32-2,54; 4: 2,54-2,76; 5: 2,76-2,98; 6: 2,98-3,2; 7: 3,2-3,43; 8: 3,43-3,65; 9: 3,65-3,87); D) Massa de cem sementes (1: 1,99-2,19; 2: 2,19-2,39; 3: 2,39-2,59; 4: 2,59-2,79; 5: 2,79-2,99; 6: 2,99-3,2; 7: 3,2-3,4; 8: 3,4-3,6; 9: 3,6-3,8)

O teste de Newman-Keuls indicou homogeneidade de médias entre a coleção original e a coleção nuclear para sete das treze variáveis contínuas analisadas. Houve diferenças de médias para NDF, CC, APM, NDM, LG e relação CG e LG. Com exceção de LG, para todas as outras características, a coleção nuclear apresentou maiores médias do que a original.

O teste de Levene indicou homogeneidade de variâncias para doze das treze características entre as duas coleções. Para NDF em que não houve homogeneidade, a variância foi maior na coleção nuclear do que na original.

Valores comparativos para a amplitude das características, médias e variâncias das 13 variáveis contínuas entre a coleção completa de acessos japoneses e a coleção nuclear são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Comparação da amplitude, média e variância entre a coleção original e a coleção nuclear para 13 variáveis contínuas

Característica	Coleção inteira de acessos japoneses			Coleção nuclear			Teste	
	Amplitude	Média	Variância	Amplitude	Média	Variância	N-K	Lev
NDF	79,58 -132,58	93,21	87,62	81,58 - 132,58	96,95	137,54	*	*
CC	48,39 -121,97	77,87	123,31	54,92 -121,97	81,57	182,33	*	NS
APM	66,02 -142,91	98,45	144,39	73,21 -142,91	102,60	209,57	*	NS
CP	16,58 -26,98	20,60	3,93	17,17 -26,98	21,10	5,41	NS	NS
CFB	16,04 -40,07	28,52	16,20	16,04 -38,08	29,33	22,67	NS	NS
LFB	1,17 -2,41	1,71	0,05	1,17 -2,41	1,78	0,07	NS	NS
NDM	109,03 -158,03	124,79	68,34	109,03 -158,03	128,21	111,08	*	NS
PG	0,12 -1,25	0,67	0,04	0,12 -1,25	0,65	0,06	NS	NS
NP	3,45 -7,95	5,46	0,75	3,65 -7,95	5,46	0,99	NS	NS
MCS	1,99 -3,8	2,98	0,11	1,99 - 3,61	2,96	0,13	NS	NS
CG	6,72 -9,91	8,30	0,39	6,72 -9,82	8,36	0,49	NS	NS
LG	2,50 -3,89	3,43	0,07	2,50 -3,89	3,31	0,09	*	NS
CG/LG	1,88 -3,87	2,45	0,11	1,94 - 3,72	2,56	0,17	*	NS

* Significativo a 5%

Os parâmetros MD%, VD%, CR% e VR% são designados para avaliar as propriedades referentes a variáveis contínuas da coleção nuclear comparadas com a coleção inteira. O MD% foi de 2,85%, inferior ao nível de 20% considerando significativo (HU; ZHU; XU, 2000) entre a coleção de 192 acessos e a coleção nuclear de 52 acessos selecionados pelo PowerCore. O VD% foi 28,26% e demonstra que a variância da coleção nuclear é ligeiramente diferente da variância da coleção inteira. O VR% compara o coeficiente de variação das características mensuradas na coleção original com o da coleção nuclear e determina quão bem a variância está sendo representada na coleção nuclear. Mais de 100% de VR% é desejável para que a coleção nuclear seja representativa da coleção original (HU; ZHU; XU, 2000). A coleção nuclear de acessos japoneses teve 116,54% sobre a coleção original, indicando que é representativa. A taxa de coincidência (CR%) indica se as distribuições da amplitude de cada característica na coleção nuclear são bem representadas quando comparadas com as da original. O CR% considerando todas as características foi de 95,08%, indicando distribuição de amplitude homogênea das características fenotípicas, pois foi maior do que 80% de acordo com Kim et al. (2007).

5.3.3 Comparação de propriedades moleculares

Tanto a coleção original quanto a coleção nuclear tiveram o mesmo número de alelos (181 alelos) encontrados para os 24 marcadores microssatélites, com uma média de 7,54 alelos por loco que variaram de 2 (RM 143, RM 146 e RM 184) a 16 (RM 257), e as frequências alélicas da coleção inteira apresentaram correlação de 0,97 ($p < 0,01$) com as da coleção nuclear. As frequências de cada alelo na coleção inteira e na coleção nuclear estão apresentadas na Figura 5.5.

Figura 5.5 - Distribuição de frequência dos 181 alelos detectados por 24 marcadores SSRs na coleção inteira e na coleção nuclear de acessos japoneses

Os índices de diversidade de Shannon Weaver e de Nei revelaram que a riqueza alélica foi mantida na coleção nuclear. A correlação entre os índices de diversidade na coleção nuclear e na coleção inteira foram de 0,98 e 0,96 ($p < 0,01$) para os índices de Shannon Weaver e de Nei, respectivamente. Distribuições dos índices de diversidade para os 24 marcadores microssatélites para a coleção original e a coleção nuclear são apresentadas na Figura 5.6.

O índice de diversidade de Nei foi de 0,49 na coleção original, variando de 0,01 (RM143) a 0,86 (RM 304). A coleção nuclear apresentou uma média de 0,60 para o índice de diversidade de Nei, com um mínimo de 0,038 (RM 143) e máximo de 0,921 (RM 304). O índice de Shannon Weaver foi de 0,99 na coleção inteira, variando de 0,033 (RM143) a 1,846 (RM 304). A coleção nuclear apresentou uma média de 1,26 com um mínimo de 0,095 (RM 143) e máximo de 2,2 (RM9).

Figura 5.6 - Distribuição dos índices de diversidade de Shannon Weaver e Nei para 24 marcadores SSRs na coleção inteira e na coleção nuclear de acessos japoneses. Os doze primeiros marcadores são marcadores SSRs genômicos e os demais são EST-SSRs. Os marcadores estão organizados conforme sua posição no genoma

Os valores de PIC variaram de 0,01 (RM 143) a 0,80 (RM 304), com média geral de 0,43 na coleção inteira, e na coleção nuclear os valores variaram de 0,037 (RM 143) a 0,867 (RM 304), com média de 0,54 para os 24 marcadores. A correlação entre os valores de PIC na coleção inteira e na coleção nuclear foi de 0,97 ($p < 0,01$).

5.3.4 Representação espacial da diversidade da coleção inteira e da coleção nuclear

A coleção nuclear abrangeu a diversidade encontrada na coleção inteira a nível fenotípico e molecular. Na Figura 5.7 é apresentada a distribuição espacial dos

acessos da coleção inteira e da coleção nuclear considerando as características fenotípicas (variáveis categóricas e contínuas) e os marcadores moleculares.

Figura 5.7 - Relação e distribuição espacial dos acessos da coleção inteira e da coleção nuclear para as características fenotípicas de variáveis categóricas (A) e contínuas (B) e marcadores moleculares microssatélites (C)

Os 52 acessos da coleção nuclear selecionada abrangeram além de todas as classes fenotípicas e alelos detectados pelos marcadores moleculares, acessos ao longo da distribuição espacial da coleção inteira. Como resultado, a coleção nuclear obtida abrangeu a diversidade da coleção inteira, enquanto conteve um número mínimo de acessos.

5.4 Discussão

A coleção nuclear dos acessos japoneses mantidos no Banco de Germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ foi composta por 52 acessos (Tabela 5.1) utilizando a estratégia M implementada no programa PowerCore. Esse número de acessos corresponde a 27% do total de acessos japoneses. O desenvolvimento de coleções nucleares foi proposto como um meio para a utilização de bancos de germoplasma de uma maneira mais efetiva e viável economicamente (FRANKEL, 1984). Brown et al. (1987) sugeriram que o número de acessos na coleção nuclear deveria conter de 5-10% da coleção inteira, e representar ao menos 70% da diversidade genética da coleção original e Van Hintum (1995) sugeriu que a proporção de acessos amostrados deveria depender do objetivo da coleção nuclear e que deveria variar entre 5 e 20% da coleção base. Estabelecendo coleções nucleares de arroz, Li et al. (2000) observaram que 5% da coleção base representou 96% da variação fenotípica e Ebanu et al. (2008) observaram que uma coleção nuclear de variedades tradicionais japonesas de arroz com 20% dos acessos representou 87,5% da diversidade usando SSRs. Zhao et al. (2010) desenvolveram uma coleção de 162 acessos de arroz, correspondendo a 4% da coleção inteira e contendo todos os alelos detectados por marcadores SSR na coleção inteira. A mini coleção do USDA, obtida usando estratégia M, foi constituída por 217 acessos representando 12,09% dos acessos da coleção nuclear e todos os alelos e classes fenotípicas detectados na coleção inteira (AGRAMA et al., 2009).

Para a coleção nuclear ser útil, ela deve incluir a maior parte da diversidade genética da coleção inteira e deve estar correlacionada com a mesma (YAN et al., 2007). A coleção nuclear de acessos japoneses representou todas as classes fenotípicas de variáveis categóricas (Figura 5.1) e de variáveis contínuas (Figuras 5.3 e 5.4), e todos os alelos identificados pelos marcadores SSRs (Figura 5.5) na coleção inteira. Os coeficientes de correlação para os índices de diversidade entre a coleção inteira e a coleção nuclear foram altos e significativos (valores de 0,92 a 0,98), o que indica que a coleção nuclear obtida efetivamente representa a diversidade genética da coleção inteira. Os coeficientes de correlação para os índices de diversidade obtidos para os marcadores moleculares foram maiores do que os observados por Zhao et al. (2010) que obtiveram a coleção nuclear utilizando dados de marcadores microssatélites.

A coleção nuclear composta por 52 acessos japoneses reteve os 181 alelos SSRs presentes na coleção inteira de 192 acessos. A *mini core subset* com 217 de arroz do USDA contém os 962 alelos da core set de 1794 acessos detectados por 70 marcadores SSRs (AGRAMA et al., 2009). Todos os alelos nem sempre são capturados na coleção nuclear. Uma coleção nuclear de milho obtida com o programa MSTRAT manteve 93% dos alelos presentes na coleção original (TOKODOVSKA et al., 2005) e uma coleção nuclear incluindo 372 acessos de trigo e formada pela estratégia M, 98% da diversidade alélica de 38 marcadores polimórficos foi representada (BALFOURIER et al., 2007).

Os índices de diversidade genética de Nei e de Shannon Weaver calculados para variáveis categóricas (Figura 5.2) e marcadores moleculares (Figura 5.6) foram maiores na coleção nuclear do que na coleção original, como é o esperado, pois acessos geneticamente similares foram removidos da coleção original. O mesmo padrão foi observado para o índice de diversidade de Nei na *mini core subset* obtida a partir da coleção nuclear do USDA (AGRAMA et al., 2009). No entanto, a diversidade observada na coleção de acessos japoneses como esperado é menor do que a existente na *mini core subset* de arroz do USDA e na coleção nuclear de acessos de arroz mantidos no *RDA-genebank* na República da Coréia (ZHAO et al., 2010).

As estimativas de MD%, VD% e VR% são usadas para medir a consistência estatística entre as coleções nuclear e inteira para as variáveis contínuas (HU; ZHU; XU, 2000; KIM et al., 2007). A diferença de médias entre a coleção inteira e a coleção nuclear para todas as características fenotípicas (MD% = 2,73%) demonstra que a média da coleção nuclear é similar à média da coleção inteira, e foi inferior às diferenças encontradas no desenvolvimento de coleções nucleares por Kim et al. (2007) e da *mini core subset* do USDA (AGRAMA et al., 2009). O nível de 20% é considerando significativo com base no proposto por Hu, Zhu e Xu (2000). A estimativa para VD foi de 26,4%, e demonstra que a variância da coleção nuclear é ligeiramente diferente da variância da coleção inteira. Esse valor foi inferior a média de diferença de variâncias observadas na obtenção de várias coleções (34,5%) de arroz por Kim et al. (2007) e foi superior ao valor (16,5%) encontrado no desenvolvimento de uma *mini core* da coleção nuclear do USDA (AGRAMA et al.,

2009). O valor encontrado também foi superior ao observado no desenvolvimento de coleções nucleares de algodão por Hu, Zhu e Xu (2000). O VR permite a comparação entre os coeficientes de variação da coleção e da coleção inteira e determina o grau de representação da coleção inteira na coleção nuclear (KIM et al., 2007). A coleção nuclear de acessos japoneses teve VR de 116,54% sobre a coleção original, valor maior que 100%, que é desejável para que a coleção nuclear seja representativa da coleção original (HU; ZHU; XU, 2000). Esse valor foi maior do que a média observada para as 10 coleções nucleares obtidas por Kim et al. (2007) que foi de 67,1% e para a mini coleção do USDA (AGRAMA et al., 2009), que foi de 102,7%. A estimativa de CR indica se a distribuição da amplitude de cada variável na coleção nuclear é representativa quando comparada com a coleção inteira. O valor encontrado para CR foi de 94,31%, indicando distribuição da amplitude homogênea das características fenotípicas, pois foi maior do que 80%, valor considerando significativo por Kim et al. (2007) e Hu, Zhu e Xu (2000). O valor foi similar ao da média dos CR observados na obtenção de 10 coleções nucleares por Kim et al. (2007) utilizando simulação, superior a de cinco coleções nucleares de algodão obtidas por Hu, Zhu e Xu (2000) e inferior a outras cinco dos mesmos autores. Também foi inferior ao da obtenção da *mini core subset* de arroz do USDA (AGRAMA et al., 2009).

Considerando cada característica contínua isoladamente, a coleção nuclear apresentou médias diferentes das da coleção inteira para sete das treze características analisadas. Houve diferenças de médias para NDF, CC, APM, NDM, LG e CG/LG (Tabela 5.2). Com exceção de LG, para todas as outras características, a coleção nuclear apresentou maiores médias do que a original. Foram observadas maiores proporções de acessos precoces e com menor CC e APM na coleção inteira do que na nuclear (Figura 5.3), e maior proporção de acessos mais tardios e mais altos na coleção nuclear do que na inteira, de forma que na diferença das médias a coleção nuclear teve maior NDF, NDM, CC e APM. Para características de grão, a coleção nuclear apresentou maior média para CG/LG e menor para LG do que a coleção inteira. Na coleção nuclear, a proporção de acessos apresentando grãos mais estreitos foi maior do que na coleção inteira, cuja proporção é maior de acessos com grãos mais largos (Figura 5.4). Como os grãos foram mais estreitos na

coleção nuclear do que na coleção inteira, e para o comprimento a proporção foi a mesma para as duas coleções, consequentemente a relação comprimento largura do grão foi maior na coleção nuclear.

Embora com essas diferenças nas médias, a amplitude da coleção nuclear (Tabela 5.2) mostrou que a maior parte dos acessos com valores extremos para as características estudadas na coleção inteira foram representados na coleção nuclear. A ocorrência de diferença nas médias para algumas características e ao mesmo tempo abrangência de todas as classes pode ser devida ao fato de que os acessos são mais igualmente distribuídos na coleção nuclear do que na coleção inteira (CHUNG et al., 2009).

Todas as características da coleção inteira foram representadas na coleção nuclear de forma que a distribuição espacial dos acessos da coleção nuclear foi similar a de todos os acessos componentes da coleção inteira (Figura 5.7).

A coleção nuclear desenvolvida abrangeu a diversidade da coleção inteira (192 acessos) ao mesmo tempo em que conteve um número mínimo de acessos (52).

Referências

ABADIE, T.; CORDEIRO, C.M.T.; FONSECA, J.R.; ALVES, R.B.N.; BURLE, M.L.; BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; CASTRO, E.M.; SILVA, H.T.; FREIRE, M.S.; ZIMMERMANN, F.J.P.; MAGALHAES, J.R.S.O. Constructing a rice core collection for Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 129–136, 2005.

AGRAMA, H.A.; EIZENGA, G.C.; YAN, W. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 19, p. 341–356, 2007.

AGRAMA, H.A.; YAN, W.G.; LEE, F.; FJELLSTROM, R.; CHEN, M.H.; JIA, M.; MCCLUNG, A. Genetic assessment of a mini-core subset developed from the USDA rice Genebank. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 1336–1346, 2009.

BALFOURIER, F.; ROUSSEL, V.; STRELCHENKO, P.; EXBRAYAT-VINSON, F.; SOURDILLE, P.; BOUTET, G.; KOENIG, J.; RAVEL, C.; MITROFANOVA, O.; BECKERT, M.; CHARMET, G. A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 14, p. 1265–1275, 2007.

BATAILLON, T.M.; DAVID, J.L.; SCHOEN, D.J. Neutral genetic markers and conservation genetics: Simulated germplasm collections. **Genetics**, Austin, v. 144, p. 409–417, 1996.

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

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

BROWN, A.H.D. Core collections: a practical approach to genetic resource management. **Genome**, Ottawa, v. 31, p. 818–824, 1989.

BROWN, A.H.D.; GRACE, J.P.; SPEER, S.S. Designation of a core collection of perennial glycine. **Soybean Genet Newsletter**, Ames, v. 14, p. 59–70, 1987.

CHUNG, H.K.; KIM, K.W.; CHUNG, J.W.; LEE, J.R.; LEE, S.Y.; DIXIT, A.; KANG, H.K.; ZHAO, W.; MCNALLY, K.L.; HAMILTON, R.S.; GWAG, J.G.; PARK, Y.J. Development of a core set from a large rice collection using a modified heuristic algorithm to retain maximum diversity. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 51, p. 1116–1125, 2009.

CORDEIRO, C.M.T.; ABADIE, T. Coleções nucleares. In: NASS, L.M. (Ed). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2007. chap. 17, p. 575–604.

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

FAO. **The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**. Rome, 2010. 399 p.

FRANCO, J.; CROSSA, J.; WARBURTON, M.L.; TABA, S. Sampling strategies for conserving maize diversity when forming core subsets using genetic markers. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 854–864, 2006.

FRANKEL, O.H. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: ARBER, W.; LIMENSEE, K.; PEACOCK, W.J.; STARLINGER, P. (Ed.). **Genetic manipulation: impact on man and society**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. p. 161–171.

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D. Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. (Ed.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen & Unwin, 1984. p. 249–257.

HOLDEN, J.H.W. The second ten years. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. (Ed). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen & Unwin, 1984. p. 277-285.

HU, J.; ZHU, J.; XU, H.M. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 264–268, 2000.

JANSEN, J.; van HINTUM, T. Genetic distance sampling: A novel sampling method for obtaining core collections using genetic distances with an application to cultivated lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, p. 421–428, 2007.

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

KIM, K.W.; CHUNG, H.K.; CHO, G.T.; MA, K.H.; CHANDRABALAN, D.; GWAG, J.G.; KIM, T.S.; CHO, E.G.; PARK, Y.J. PowerCore: A program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 2155–2162, 2007.

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

LI, Z.C.; ZHANG, H.L.; ZENG, Y.W.; YANG, Z.Y.; SHEN, S.Q.; SUN, C.Q.; WANG, X.K. Study on sampling schemes of core collection of local varieties of rice in Yunnan, China. **Scientia Agricultura Sinica**, Beijing, v. 33, p. 1-7, 2000.

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

MARITA, J.M.; RODRIGUEZ, J.M.; NIENHUIS, J. Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 47, p. 515–526, 2002.

MOE, K.T.; GWAG, J.G.; PARK Y.J. Efficiency of PowerCore in core set development using amplified fragment length polymorphic markers in mungbean. **Plant Breeding**, Berlin, v. 131, p. 110-117, 2012.

RAO, E.S.; KADIRVEL, P.; SYMONDS, R.C.; GEETHANJALI, S.; EBERT, A.W. Using SSR markers to map genetic diversity and population structure of *Solanum pimpinellifolium* for development of a core collection. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, Cambridge, doi:10.1017/S1479262111000955, 2011. Disponível em:
<<http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FPGR%2FS1479262111000955a.pdf&code=b24e39da0cb5e4700e7fa9d615b280fd>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

TODOROVSKA, E.; ABUMHADI, N.; KAMENAROVA, K.; JELEVA, D.; KOSTOVA, A.; CHRISTOV, N.; ALEXANDROVA, N.; JACQUEMIN, J.-M.; ANZAI, H.; NAKAMURA, C.; ATANASSOV, A. Biotechnological approaches for cereal crops improvement: Part II. Use of molecular markers in cereal breeding. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 19, p. 91–104, 2005.

UPADHYAYA, H.D.; FURMAN, B.J.; DWIVEDI, S.L.; UDUPA, S.M.; GOWDA, C.L.L.; BAUM, M.; CROUCH, J.H.; BUHARIWALLA, H.K.; SINGH, S. Development of a composite collection for mining germplasm possessing allelic variation for beneficial traits in chickpea. **Plant Genetic Resources**, Cambridge, v. 4, p. 13–19, 2006.

van HINTUM, T.J.L. Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. In: HODGKIN, T.; BROWN, A.H.D.; van HINTUM, T.J.L. (Ed.). **Core collections of plant genetic resources**. Chichester: Wiley, 1995. p. 23–34.

YAN, W.G.; RUTGER, J.N.; BRYANT, R.J.; BOCKELMAN, H.E.; FJELLSTROM, R.G.; CHEN, M.H.; TAI, T.H.; McCLUNG, A.M. Development and evaluation of a core subset of the USDA rice (*Oryza sativa* L.) germplasm collection. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 869–878, 2007.

ZEULI P.L.S.; QUALSET, C.O. Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resource collection of durum wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, p. 295–304, 1993.

ZHAO, W.G.; CHO, G.T.; MA, K.H.; CHUNG, J.W.; GWAG, J.G.; PARK, Y.J. Development of an allele-mining set in rice using a heuristic algorithm and SSR genotype data with least redundancy for the post-genomic era. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 26, p. 639–651, 2010.

6 CONCLUSÕES

No estudo realizado com os acessos japoneses de arroz do banco de germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ conclui-se que:

Para caracterização agromorfológica:

- Os acessos apresentam variabilidade fenotípica, tanto para variáveis contínuas como para variáveis categóricas;
- As distâncias entre pares de acessos para as variáveis categóricas e para as variáveis contínuas apresentaram baixa correlação e diferentes padrões de agrupamento dos acessos foram observados para cada tipo de variável.
- A interação genótipo por ano foi significativa para cinco características avaliadas, e resultou em diferentes padrões de agrupamento quando considerada na análise de diversidade.

Para caracterização molecular:

- Mais de 98% dos acessos pertencem à subespécie japônica e os níveis de diversidade detectados são comparáveis com os encontrados para a subespécie em escala global.

Para caracterização da tolerância ao frio na germinação:

- Os acessos apresentam variabilidade para características de tolerância ao frio na germinação, com reduções nos comprimentos de coleóptilo e radícula devido ao frio comparáveis com as de testemunhas tolerantes ao frio e comprimentos de coleóptilo inferiores, tanto sob estresse por frio quanto em temperatura ótima.
- A interação temperatura por genótipo é significativa para índice de velocidade de germinação e comprimento do coleóptilo.

Para coleção nuclear:

- A diversidade contida nos 192 acessos pode ser representada pelos 52 acessos que constituem a coleção nuclear.

Assim, considera-se que o agrupamento mais consistente foi aquele obtido a partir das informações agromorfológicas em diferentes ambientes (anos agrícolas).

O estudo também permitiu identificar que existem acessos com potencial para cultivo em regiões onde ocorrem baixas temperaturas no período da germinação. Isto porque o desempenho de alguns genótipos foi semelhante ao das testemunhas tolerantes ao frio utilizadas como padrões.

Uma subcoleção ou coleção nuclear com número reduzido de acessos foi obtida permitindo a manutenção de quase totalidade da variabilidade verificada com base nos caracteres agromorfológicos e também moleculares. Este novo conjunto de acessos pode ser melhor avaliado em diferentes ambientes e com maior precisão experimental visando a confirmação da consistência do agrupamento obtido.

ANEXOS

ANEXO A - Acessos japoneses pertencentes ao Banco de Germoplasma de arroz cultivado do Departamento de Genética da ESALQ/USP

(continua)

Acesso	Nome do acesso	Status*	Tipo*
001J	Kunihikari Mochi	Landrace	Sequeiro
002J	Senshou	Landrace	Sequeiro
003J	Fukuton	Landrace	Sequeiro
006J	Ezo Wase	Landrace	Sequeiro
008J	Shin Hakaburi	Desconhecido	Desconhecido
012.6J	Senshou Ibaragi 1	Desconhecido	Desconhecido
014J	Yamanoi	Melhorado	Sequeiro
016J	Namekata Mochi	Landrace	Sequeiro
023J	Sonobe Mochi	Landrace	Sequeiro
024J	Wase Mochi	Landrace	Sequeiro
025J	Seion Uruchi	Landrace	Sequeiro
027J	Gaisen Mochi	Landrace	Sequeiro
029J	Shiro Hige	Desconhecido	Desconhecido
035J	Kinkabou	Landrace	Sequeiro
036J	Nakaahara Mochi	Desconhecido	Desconhecido
038J	Nourin Mochi	Desconhecido	Desconhecido
040J	Toukyo Hirayama	Desconhecido	Desconhecido
041J	Iwata Hata Mochi	Desconhecido	Desconhecido
042J	Susono Mochi	Desconhecido	Desconhecido
045J	Mitsukasane	Landrace	Sequeiro
048J	Mie	Landrace	Sequeiro
050J	Wase Esoshima Mochi	Desconhecido	Desconhecido
052J	Mizuhoshi	Landrace	Sequeiro/ Irrigado
054J	Kyuushuu	Landrace	Sequeiro
055J	Oohata Mochi	Landrace	Sequeiro
056J	Miyako	Landrace	Sequeiro / Irrigado
057J	Yoridashi	Landrace	Sequeiro / Irrigado
068J	Nourin 24	Desconhecido	Desconhecido
069J	Saitama Senshou	Melhorado	Sequeiro
070J	Kirishima	Landrace	Sequeiro
074J	Aichi Rikutou 1	Melhorado	Sequeiro
078J	Yonoyuki Mochi	Landrace	Sequeiro
079J	Dango Mochi	Landrace	Sequeiro
080J	Sangoku	Landrace	Sequeiro
082J	Terenzu	Landrace	Sequeiro
092J	Iwate Kurumi Wase 1	Melhorado	Sequeiro
099J	Eika Ine	Landrace	Sequeiro
106J	Araki	Landrace	2Sequeiro/3Irrigado
107J	Oiran	Landrace	Sequeiro

ANEXO A - Acessos japoneses pertencentes ao Banco de Germoplasma de arroz cultivado do
Departamento de Genética da ESALQ/USP

(continuação)

Acesso	Nome do acesso	Status*	Tipo*
110J	Mikuni No Homare	Landrace	Sequeiro
112J	Japão 1	Desconhecido	Desconhecido
113J	Kyuushuu	Landrace	Sequeiro
117J	Gaisen Ibaragi 1	Desconhecido	Desconhecido
118J	Kurombo	Desconhecido	Desconhecido
119J	Shiotsuka Wase	Landrace	Sequeiro
121J	Nourin 5	Desconhecido	Desconhecido
122J	Chiyoda Wase	Landrace	Sequeiro
125J	Touzan Mochi	Desconhecido	Desconhecido
127J	Hakamuri 20	Melhorado	Sequeiro
129J	Esojima Mochi	Landrace	Sequeiro
130J	Esojima	Desconhecido	Desconhecido
131J	Mino	Landrace/Melhorado	Sequeiro/Irrigado
133J	Nourin Mochi	Desconhecido	Desconhecido
134J	Suzume Shirazu	Desconhecido	Desconhecido
136J	Nourin Mochi	Desconhecido	Desconhecido
139J	Nourin Mochi 1	Desconhecido	Desconhecido
140J	Nourin Mochi 17	Desconhecido	Desconhecido
144J	Miyamae Okute	Landrace	Sequeiro
147J	Kukutomi	Desconhecido	Desconhecido
150J	Atoshirazu	Landrace	Sequeiro
153J	Col/Fuzui/1965	Desconhecido	Desconhecido
156J	Tachiminori	Melhorado	Sequeiro
159J	Minami Hata Mochi	Desconhecido	Desconhecido
160J	Gaisen Mochi	Landrace	Sequeiro
164J	No Mochi	Landrace	Sequeiro
165J	Takasago Wase	Landrace	Sequeiro
170J	Tanaka Yakan	Landrace	Sequeiro
171J	Oosumi	Melhorado	Sequeiro
172J	Oohataho	Landrace	Sequeiro
173J	Nourin 11	Desconhecido	Desconhecido
174J	Col/Miyazaki/1963	Desconhecido	Desconhecido
175J	Tomoe Mochi	Landrace	Sequeiro
176J	Shinshuu Wase	Landrace	Sequeiro
177J	Nourin 16	Desconhecido	Desconhecido
179J	Urasan 1	Melhorado	Sequeiro
183J	Yashino Mochi	Desconhecido	Desconhecido
186J	Kirishima	Landrace	Sequeiro
188J	Chiba Senshou	Melhorado	Sequeiro

ANEXO A - Acessos japoneses pertencentes ao Banco de Germoplasma de arroz cultivado do Departamento de Genética da ESALQ/USP

(continuação)

Acesso	Nome do acesso	Status*	Tipo*
189J	Okabo	Landrace	Sequeiro/Irrigado
191J	Col/Fuzui/1965	Desconhecido	Desconhecido
197J	Toga	Landrace	Sequeiro
199J	Kahee	Landrace	Sequeiro
200J	Hitachi Nishiki	Landrace	Sequeiro
202J	Ooba Kirishima	Landrace	Sequeiro
203J	Horarin	Landrace	Sequeiro
205J	Matsuyama	Landrace	Sequeiro
206J	Taishou Mochi	Landrace	Sequeiro
209J	Kangyouho	Desconhecido	Sequeiro
213J	Japão 2	Desconhecido	Desconhecido
214J	Kaneko Mochi	Landrace	Sequeiro
216J	Iwate Kurumi Wase 1	Melhorado	Sequeiro
217J	Col/Miyazaki/1963	Desconhecido	Desconhecido
218J	Toukyo Kaneko	Desconhecido	Desconhecido
219J	Gaisen (4x)	Desconhecido	Desconhecido
221J	Ishikawa	Desconhecido	Sequeiro
228J	Tariu Saku Mochi	Desconhecido	Desconhecido
229J	Col/Tokushima/1967	Desconhecido	Desconhecido
230J	Miyanishiki	Landrace/Melhorado	Sequeiro/Irrigado
235J	Hatamurasaki	Melhorado	Sequeiro
236J	Toga	Landrace	Sequeiro
237J	Rikutou Shinriki 1	Melhorado	Sequeiro
239J	Col/Miyazaki/1963	Desconhecido	Desconhecido
245J	Ishiwari Mochi	Landrace	Sequeiro
246J	Mizugirai Mochi	Landrace	Sequeiro
248J	Col/Tokushima/1967	Desconhecido	Desconhecido
250J	Jouon	Landrace	Sequeiro
252J	Oota Wase	Landrace	Sequeiro
256J	Shizuoka	Desconhecido	Desconhecido
257J	Hiderishirazu	Landrace	Sequeiro/Irrigado
259J	Iwate Ryoon 1	Desconhecido	Desconhecido
260J	Kozo	Landrace	Sequeiro
261J	Kahei	Landrace	Sequeiro
263J	Tamasari 3	Melhorado	Sequeiro
264J	Miyakonojoo Mochi	Landrace	Sequeiro
268J	Ookuma Nishiki	Desconhecido	Desconhecido
269J	Nourin Mochi 6	Desconhecido	Desconhecido
271J	Taishou Nishiki	Landrace	Sequeiro

ANEXO A - Acessos japoneses pertencentes ao Banco de Germoplasma de arroz cultivado do
Departamento de Genética da ESALQ/USP

(continuação)

Acesso	Nome do acesso	Status*	Tipo*
273J	Shina Mochi	Landrace	Sequeiro
274J	Nagae Wase	Melhorado	Sequeiro
276J	Arabiya Mochi	Desconhecido	Desconhecido
277J	Tozo Mochi	Desconhecido	Desconhecido
278J	Urasar	Desconhecido	Desconhecido
279J	Ootama	Landrace	Sequeiro/Irrigado
280J	Okabo Mochi	Landrace	Sequeiro
284J	Furuwase	Desconhecido	Desconhecido
285J	Hirakawa Okute	Landrace	Sequeiro
286J	Nourin 7	Desconhecido	Desconhecido
287J	Oiran	Landrace	Sequeiro
289J	Shinhoku Daiou Mochi	Desconhecido	Desconhecido
290J	Riku Araki	Landrace	Sequeiro
293J	Suzume Shirazu	Desconhecido	Desconhecido
294J	Col/Miyazaki/1963	Desconhecido	Desconhecido
295J	Hideshirazu Mochi	Desconhecido	Desconhecido
299J	Japão 3	Desconhecido	Desconhecido
301J	Nourin Mochi 4	Desconhecido	Desconhecido
302J	Kazusa Wase	Landrace	Sequeiro
304J	Shinkuko Mochi	Desconhecido	Desconhecido
308J	Hikouki Gome	Landrace	Sequeiro
310J	Senshou	Landrace	Sequeiro
311J	Shindai Okoshi	Landrace	Sequeiro
312J	Col/Ooita/1964	Desconhecido	Desconhecido
314J	Taiwan Mochi	Landrace	Sequeiro
315J	Urasan	Landrace	Sequeiro
317J	Owari Mochi	Landrace/Melhorado	Sequeiro
320J	Nourin Mochi 2	Desconhecido	Desconhecido
322J	Senshou	Landrace	Sequeiro
325J	Gaisen Mochi 909	Melhorado	Sequeiro
330J	Japão 4	Desconhecido	Desconhecido
331J	Rikuu	Desconhecido	Desconhecido
335J	Rikuu 23	Melhorado	Sequeiro
336J	Ohata Wase	Landrace	Sequeiro
337J	Japão 5	Desconhecido	Desconhecido
338J	Japão 6	Desconhecido	Desconhecido
339J	Owari 79	Melhorado	Sequeiro
346J	Ouu 22	Melhorado	Sequeiro/Irrigado
352J	Rikuu 15	Melhorado	Sequeiro/Irrigado

ANEXO A - Acessos japoneses pertencentes ao Banco de Germoplasma de arroz cultivado do Departamento de Genética da ESALQ/USP

(conclusão)

Acesso	Nome do acesso	Status*	Tipo*
355J	Col/Miyazaki/1963	Desconhecido	Desconhecido
356J	Rikuu 13	Melhorado	Sequeiro
357J	Rikuu 22	Melhorado	Sequeiro
364J	Fujimizu Bansei	Landrace	Sequeiro
365J	Iwate Kinsen 1	Melhorado	Sequeiro
367J	Bansei Tarou	Landrace	Sequeiro
368J	Shiro Uzura	Landrace	Sequeiro
369J	Japão 7	Desconhecido	Desconhecido
370J	Japão 8	Desconhecido	Desconhecido
373J	Mogami Uruchi 1	Melhorado	Sequeiro
374J	Gaisen	Landrace	Sequeiro
378J	Okka Modoshi	Landrace	Sequeiro
379J	Mino Senshutsu	Landrace	Sequeiro
380J	Japão 9	Desconhecido	Desconhecido
382J	Kurohige	Landrace	Sequeiro
383J	Mogami Chikanari 1	Landrace	Sequeiro
384J	Kounoso Rikutou 2	Desconhecido	Desconhecido
386J	Minami Hata Mochi	Desconhecido	Desconhecido
387J	Wase Shinshuu	Landrace	Sequeiro
389J	Igisu Mochi	Landrace	Sequeiro
391J	Kurumi Wase 43	Melhorado	Sequeiro
393J	Hiderishirazu	Landrace	Sequeiro/Irrigado
394J	Susono Mochi	Desconhecido	Desconhecido
395J	Seta Gaisen	Landrace	Sequeiro
397J	Korotou Mochi	Landrace	Sequeiro
400J	Owari Hata Mochi	Desconhecido	Desconhecido
401J	Ishiyakushi Mochi	Landrace	Sequeiro
402J	Shiro Hige	Desconhecido	Desconhecido
407J	Edogawa	Landrace	Sequeiro
408J	Gose Yonkoku	Landrace	Sequeiro
409J	Mie	Landrace	Sequeiro
410J	Shizouka	Desconhecido	Desconhecido
413J	Chousen	Landrace	Sequeiro/Irrigado
415J	Tosa Mochi	Landrace	Sequeiro
418J	Aogara	Landrace	Sequeiro/Irrigado
012.7J	Japão 10	Desconhecido	Desconhecido

* Informações referentes à *Status* e *Tipo* foram pesquisadas no site do *National Institute of Agrobiological Science* - NIAS. As informações de código e nome do acessos são de registros do banco de germoplasma de arroz do Departamento de Genética da ESALQ/USP.