

137. USO DAS FERRAMENTAS DA BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO ARROZ: UMA VISÃO DA EMBRAPA

Flávio Breseghello¹

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das plantas mais bem pesquisadas, devido à sua grande importância econômica e social, e suas características favoráveis aos estudos genéticos, como genoma diplóide de tamanho relativamente pequeno, ciclo de vida curto e alta prolificidade. Enquanto a pesquisa em milho dá-se majoritariamente no setor privado, a pesquisa em arroz é pública em sua maioria. Contribuiu para isto o hábito de reprodução autogâmico, que facilita a produção de sementes fiéis às características da cultivar, tornando mais difícil a apropriação dos direitos do obtentor, quando comparado com o milho híbrido. Com o surgimento do arroz híbrido este quadro pode começar a se alterar, atraindo maior atenção do setor privado para o melhoramento genético do arroz.

O papel geopolítico do arroz é enorme. A escassez deste grão tem o potencial de desestabilizar governos e gerar convulsão social. Durante a crise dos estoques de arroz em 2008, vários países, inclusive o Brasil, restringiram as exportações, priorizando o abastecimento interno, apesar dos preços no mercado internacional estarem em níveis altos sem precedentes. Esta importância vital para a estabilidade política faz com que um suprimento adequado de arroz seja do interesse de todos os países, sejam eles grandes consumidores de arroz ou não. A África, por exemplo, é hoje grande importadora de arroz, com demandas crescentes e produção estagnada. Muitos países africanos estão colocando a produção de arroz entre as prioridades políticas nacionais, por verem neste cereal o maior potencial para aumento da produção e superação da dependência externa quanto a alimentos. O Brasil, por sua vez, é visto no cenário internacional como um provedor de soluções tecnológicas para a produção em ambientes tropicais, e possível gerador de excedentes de produção, que podem ajudar a regular o mercado externo. Por isso, a pesquisa em genética de arroz no Brasil merece ser priorizada nas carteiras de fomento à pesquisa.

A SITUAÇÃO ATUAL DA PESQUISA EM BIOTECNOLOGIA DE ARROZ NO BRASIL

As pesquisas brasileiras em biotecnologia de arroz têm focado mais na exploração da variabilidade genética das populações do que no desenvolvimento de ferramentas para a seleção assistida. Marcadores neutros e altamente polimórficos, como os SSR, quando distribuídos pelo genoma, distantes entre si o suficiente para que sua segregação seja aproximadamente independente, permitem estimar a similaridade entre pares de indivíduos, o que por sua vez permite fazer uma série de inferências genéticas quanto às populações estudadas. Alguns exemplos da utilidade deste tipo de informação, em melhoramento de plantas, são

- i) Confirmar a paternidade em cruzamentos dirigidos;
- ii) Identificar linhagens com maior exatidão, somando-se aos dados de DHE (distinguíbilidade, homogeneidade e estabilidade), para fins de proteção de cultivares;
- iii) Testar a pureza de sementes genéticas, e identificar as causas do aparecimento de variantes em lotes de sementes;
- iv) Monitorar a variabilidade genética existente em populações de seleção recorrente;
- v) Acelerar a recuperação do genoma do genitor recorrente no melhoramento por retrocruzamento;
- vi) Selecionar genitores, visando a maximizar ou minimizar a variabilidade dentro de famílias, dependendo do objetivo do cruzamento.

Este tipo de aplicação não depende de nenhum conhecimento da relação entre marcadores e características fenotípicas. As pesquisas necessárias ao desenvolvimento deste tipo de ferramenta são apenas de cunho tecnológico, visando ao aumento da eficiência e à redução do custo de genotipagem.

¹ Engenheiro Agrônomo, PhD em Genética e Melhoramento de Plantas. Pesquisador e Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Arroz e Feijão. CP 179, Santo Antônio de Goiás, GO, 75375-000. www.cnpaf.embrapa.br. Email: flavio@cnpaf.embrapa.br.

Para isto, identificaram-se marcadores com alto polimorfismo e fez-se a organização dos mesmos em conjuntos de 5 ou 6 marcadores que podem ser genotipados simultaneamente, chamados “multiplexes” (PESSOA FILHO et al., 2007; BORBA et al., aceito para publicação).

Tais ferramentas foram utilizadas para estudar a variabilidade genética da coleção nuclear de arroz da Embrapa – CNAE. A CNAE foi desenvolvida pela seleção de 550 acessos do banco de germoplasma da Embrapa, de forma a maximizar a representatividade e minimizar a redundância (ABADIE et al., 2005). Coleções nucleares ou “*core collections*” têm sido desenvolvidas em muitas instituições, com o objetivo de facilitar o uso dos recursos genéticos pelo melhoramento vegetal. A coleção nuclear é o material mais indicado para a busca inicial de fontes de características novas, como a resistência a algum novo patógeno ou estresse abiótico. Borba et al. (aceito para publicação) caracterizaram acessos pertencentes à CNAE com marcadores SSR e identificaram a estrutura de população dos acessos, a qual mostrou-se coerente com sua origem e sistema de cultivo. No entanto, encontrou-se grande variabilidade dentro de acessos do banco de germoplasma, demonstrando que a conservação *ex situ* deve ser feita observando-se um razoável tamanho efetivo de população, para que não ocorra erosão genética. Brondani et al. (2006) estudaram a variabilidade genotípica de variedades tradicionais de arroz com marcadores moleculares, demonstrando que os nomes utilizados pelos agricultores para identificar os materiais tinham pouca relação com a identidade genética destes.

Marcadores moleculares têm sido utilizados para o estudo de *Oryza glumaepatula*, uma espécie silvestre de arroz que ocorre naturalmente na América do Sul. Esta espécie apresenta genoma AA, do mesmo grupo de *O. sativa* (VAUGHAN et al., 2003), sendo, portanto, promissora como fornecedora de nova variabilidade útil para o melhoramento de arroz. O estudo da variabilidade genética (BUSO et al., 1998) e da estrutura de populações (BRONDANI et al., 2005) de *O. glumaepatula* forneceu informação útil para a definição de estratégias de coleta e conservação desta espécie. Brondani et al. (2002) estudaram o potencial de *O. glumaepatula* como doadora de genes para *O. sativa*, detectando alguns QTL em que o alelo silvestre contribuiu favoravelmente para componentes de produção. Linhagens derivadas da introgressão de segmentos cromossômicos de *O. glumaepatula* em *O. sativa* estão sendo avaliadas quanto às características agronômicas (RANGEL et al., 2008).

A busca de genes que confiram maior tolerância à seca é uma linha de pesquisa que ganhou força recentemente, motivada pela perspectiva de mudança climática e redução da disponibilidade de água para irrigação. O Projeto *Orygens* foi iniciado pela Embrapa em 2002, e entre outras ações desenvolveu populações segregantes quanto à tolerância ao estresse hídrico, construiu mapas de ligação e estudou a expressão diferencial de genes. Genes candidatos expressos em raízes de arroz de terras altas foram identificados pela análise de bibliotecas subtrativas de cDNA entre uma cultivar resistente e uma cultivar suscetível à seca (RABELLO et al., 2008). Um novo projeto de pesquisa, focado no melhoramento assistido por marcadores em arroz, milho, sorgo e trigo, para regiões sujeitas a estresses hídricos, será iniciado em 2010. Novas populações estão sendo desenvolvidas, e a abordagem associativa será intensificada. Com este novo projeto, somado aos resultados do Projeto *Orygens*, espera-se desenvolver metodologia para a seleção assistida por marcadores moleculares para tolerância à seca em arroz.

O CENÁRIO INTERNACIONAL DA APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DO ARROZ

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares para estudos genéticos, percebeu-se que a sequência genômica do arroz apresentava surpreendente colinearidade com outras gramíneas e que, portanto, o genoma do arroz poderia servir como uma ponte para a elucidação de mecanismos genéticos em outras espécies menos estudadas ou com genomas mais complexos (GALE; DEVOS, 1998). Todos estes fatores fizeram com que surgisse um grande contingente de pesquisadores do setor público e privado com interesse na pesquisa genômica do arroz. Este interesse culminou com o completo seqüenciamento do genoma do arroz *japonica* (GOFF et al., 2002) e *indica* (YU et al., 2002), publicados na mesma edição da revista *Science* em 1992.

A primeira abordagem amplamente disseminada para o estudo das relações entre os polimorfismos de sequência genômica e as características importantes do ponto de vista agronômico ou

tecnológico foi a análise de QTL (*quantitative trait loci*, primeira revisão em Tanksley 1993). Para isto, populações são obtidas a partir do cruzamento de duas linhas puras, seguido de gerações de autofecundação, retrocruzamento ou haplodiploidização. A construção de mapas genéticos se faz pela análise da cossegregação entre marcadores, de forma que os grupos de ligação emulam os cromossomos. Testes estatísticos da hipótese de nulidade “ausência de QTL” são feitos em intervalos regulares sobre estes grupos de ligação, e a plotagem destes testes sobre o desenho dos grupos constituem os chamados “mapas de QTL”.

A grande maioria dos trabalhos de QTL começa e termina mencionando a potencial utilidade destes mapas para o melhoramento genético, mas a realidade é que os mapas de QTL são apenas um esboço da distribuição do controle genético das diferenças, quanto à característica estudada, entre os dois pais envolvidos no cruzamento que deu origem à população de mapeamento. O desenvolvimento de ferramentas úteis ao melhoramento, a partir de mapas de QTL, depende de fases posteriores, sendo a mais comum o mapeamento fino dos QTL de maior efeito e/ou maior estabilidade. O caso do gene *Sub1*, que confere tolerância à submersão em arroz, é um exemplo perfeito do refinamento gradual do mapeamento de um gene, até a sua clonagem e determinação de sua função (XU; MCKILL 1996; XU et al., 2000, 2004). O trabalho em torno deste gene, no IRRI (*International Rice Research Institute*), demonstra também como um mesmo projeto, quando conduzido por uma equipe multidisciplinar e altamente qualificada, pode resultar em um artigo na *Nature* (XU et al., 2006) e também em cultivares para pequenos produtores.

No ano de 2001, a equipe do Dr. Edward Buckler publicou um artigo com a aplicação de uma abordagem utilizada na genética humana ao mapeamento de genes em milho (REMINGTON et al., 2001). Esta abordagem, conhecida como mapeamento associativo ou análise de associação, veio a superar as maiores limitações do mapeamento de QTL, no que se refere ao melhoramento de plantas. Ao invés de estudar o contraste entre duas linhas puras, a análise de associação é feita em um painel de germoplasma, que pode ser montado de acordo com os objetivos do estudo. Dessa forma, a amostragem alélica é muito maior, permitindo ao mesmo tempo o mapeamento de genes e o conhecimento da variabilidade genética do material estudado. Esta abordagem integrou as áreas de biotecnologia, recursos genéticos e melhoramento, instigando a curiosidade mesmo dos melhoristas mais céticos quanto à biotecnologia.

O uso de um painel de linhagens divergentes, em mapeamento associativo, implica em dificuldades estatísticas maiores, quando comparado à análise de populações biparentais. Por outro lado, se métodos de análise adequados forem utilizados (YU et al., 2006), a maior profundidade da genealogia que liga os componentes do painel resulta em maior resolução do mapeamento. O surgimento do mapeamento associativo contribuiu para um renovado interesse nos modelos mistos para a análise genética, pois estes modelos são robustos para o tratamento de dados desbalanceados, como normalmente ocorre em painéis de germoplasma.

Uma das maiores limitações do mapeamento associativo é o seu baixo poder para detectar o efeito de alelos que existem em baixa frequência no painel utilizado. Na maioria dos trabalhos, os alelos presentes em menos de 5% das plantas do painel são desprezados, pois a sua inclusão resultaria em tamanhos de amostra extremamente desbalanceados, com conseqüências estatísticas indesejáveis, além de um grande aumento do requerimento computacional. A desenho experimental conhecido como NAM (*nested association mapping*, YU et al., 2008) é uma combinação entre o mapeamento associativo e o mapeamento de QTL, que contorna este problema. Para implementar o NAM, seus proponentes desenvolveram um conjunto de populações segregantes a partir do cruzamento de cada membro do painel de associação com um testador, de forma que cada alelo, mesmo que raro no painel, seja amostrado várias vezes, nas plantas de pelo menos uma das populações biparentais. Há que se considerar, no entanto, que a abordagem NAM impõe um pesado trabalho de desenvolvimento de populações, fenotipagem e genotipagem.

O mapeamento associativo foi rapidamente aceito pela comunidade científica, sendo visto muitas vezes como um substituto do mapeamento de QTL. Na verdade, ambas as técnicas e complementam, pois o mapeamento de QTL permite definir regiões-alvo, que podem ser estudadas via análise de associação. De fato, o mapeamento de QTL em uma população biparental permite “escanear” completamente o genoma, com um mapa composto por pouco mais de 100 marcadores bem

distribuídos, enquanto que o mapeamento associativo de todo o genoma utilizando um painel de germoplasma diverso exige um número muito grande de marcadores, na ordem dos milhares. Isto se deve ao fato de que mapas genéticos são medidos em unidades de recombinação, ou probabilidades destes eventos. Quanto maior o número de meioses na árvore genealógica que liga os acessos componentes do painel de associação, maior será o número de marcadores necessário para a varredura completa do genoma (FLINT-GARCIA et al., 2003). A acumulação de eventos de recombinação ao longo das árvores genealógicas causa o decaimento do desequilíbrio de ligação, fazendo com que apenas locos proximalmente ligados permaneçam associados. O desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*, ou *LD*) remanescente é a base do mapeamento associativo que, por isso, também é conhecido como *LD mapping*.

Do ponto de vista do melhoramento de arroz, o mapeamento associativo pode ser realizado basicamente com três tipos de painéis: coleções de germoplasma, linhagens-elite ou populações sintéticas. As coleções nucleares são o material mais promissor no que tange à descoberta de nova variabilidade alélica, mas são as que requerem maior densidade de genotipagem. As linhagens-elite requerem menor esforço de genotipagem e normalmente apresentam dados fenotípicos pré-avaliados pelos programas de melhoramento, no entanto a resolução alcançada no mapeamento e a variabilidade alélica tendem a ser menores. As populações sintéticas, conduzidas sob seleção recorrente, apresentam-se como uma alternativa intermediária, e portanto interessante para este tipo de estudo (BRESEGHELLO; SORRELLS, 2006). Um painel de associação composto por 160 linhas endogâmicas foi derivado da população sintética de arroz de terras altas CNA6, e é identificado como CNA6*. Este painel está sendo utilizado para a detecção de associação de genes candidatos para tolerância ao alumínio tóxico em arroz.

PROPOSTA DE PLATAFORMA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM DIVERSIDADE GENÉTICA DE ARROZ

Uma nova iniciativa está sendo liderada pela Universidade de Cornell e o IRRI, visando a desenvolver um microarranjo de DNA que permitirá genotipar 600 mil marcadores do tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) em um indivíduo, simultaneamente. O chip “600 K” conterá pelo menos um SNP em cada gene do arroz, e um SNP a cada 1000 nucleotídeos do genoma. Esta iniciativa, chamada de “*Rice Diversity Research Platform*”, envolve diversas outras instituições que atuam na pesquisa genética de arroz (WARDA, USDA-ARS, CIRAD, JIRCAS, *Generation Challenge Programme* e Universidade de Aberdeen) e empresas privadas (RiceTec, DevGen, Bayer e Syngenta). A Embrapa integrará o consórcio, participando do desenvolvimento do chip e genotipando acessos de interesse do Brasil. No entanto, esta pode ser uma oportunidade para a integração da biotecnologia do arroz no Brasil com a comunidade internacional, com foco no melhoramento genético. Se a comunidade científica do arroz no Brasil juntar esforços, esta iniciativa renderá resultados para todos os programas de pesquisa nacionais, tanto no aspecto científico quanto no aspecto aplicado.

A primeira fase do projeto consistirá no desenvolvimento do chip, o qual será feito pelo ressequenciamento de um pequeno número de acessos representativos do germoplasma cultivado, o alinhamento das sequências e a detecção de polimorfismos por comparação, em um intenso trabalho de bioinformática. Os SNP detectados serão organizados em um chip para genotipagem automatizada, utilizando tecnologia Affymetrix (www.affymetrix.com). A Embrapa fará o ressequenciamento das cultivares de arroz de terras altas “Caiaçó” e “BRS Sertaneja”, representativos do arroz *japonica* tropical, o qual é menos estudado pelas outras instituições. A presença de materiais brasileiros no painel de detecção garantirá que polimorfismos de interesse do nosso germoplasma estejam representados no chip.

A segunda fase do projeto consistirá na genotipagem das linhagens e cultivares com o chip 600 K. Cada instituição custeará a genotipagem de seu material. O IRRI irá genotipar 1200 materiais selecionados, e o USDA-ARS irá genotipar 850 acessos. O número de materiais brasileiros a serem genotipados ainda não foi definido, e dependerá da disponibilidade de recursos. Como o consórcio compartilhará os dados obtidos, o resultado permitirá comparar o germoplasma brasileiro com o germoplasma mundial, para cada ponto do genoma. Esta informação poderá indicar novos rumos para o

melhoramento de arroz no Brasil, o qual ainda tem explorado um germoplasma restrito, se comparado à diversidade global de *O. sativa*.

A terceira fase do projeto será a utilização dos materiais genotipados como um painel de mapeamento associativo, o qual permitirá a varredura do genoma do arroz para a identificação de genes relacionados a qualquer característica que possa vir a ser avaliada nestas plantas. Esta fase exigirá intensa fenotipagem a campo e em laboratório, quanto às características agronômicas, de qualidade de grãos e resistência aos estresses bióticos e abióticos, e provavelmente estender-se-á por vários anos, até que se explore toda a informação gerada pelo cruzamento dos dados do chip com dados fenotípicos. A identificação de marcadores associados a características de interesse, ou dos genes causais propriamente ditos, permitirá que o melhoramento de arroz passe a ser feito de uma forma muito mais precisa e eficiente.

NECESSIDADE DE FORMAÇÃO DE EQUIPES MULTIDISCIPLINARES PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DE ARROZ

Avanços significativos foram feitos no Brasil, principalmente no desenvolvimento de capacidade instalada e na formação de recursos humanos. No entanto, quando se considera o tamanho e o dinamismo da pesquisa mundial em biotecnologia de arroz, a participação brasileira ainda tem sido tímida.

Análises de QTL têm sido freqüentes em trabalhos de tese nos programas de pós-graduação em melhoramento de plantas no Brasil e no exterior. No entanto, o fato de que a grande maioria dos trabalhos não tenha gerado uma ferramenta diretamente aplicável ao melhoramento genético contribuiu para gerar certo ceticismo entre os melhoristas da vertente clássica quanto à utilidade da biologia molecular para o melhoramento. Tanto a falta de resultados práticos, de um lado, quanto o ceticismo, de outro, são frutos da falta de entrosamento entre biotecnólogos e melhoristas, e do limitado conhecimento das áreas recíprocas. A maioria dos biotecnólogos são jovens sem experiência de melhoramento, enquanto que a maioria dos melhoristas são profissionais maduros, que fizeram seus doutorados antes do advento da biotecnologia.

Esta polarização da comunidade científica tem sido danosa ao avanço do melhoramento de arroz no Brasil, e pode ser simbolizada pelo edital do CNPq (Edital MCT/CNPq/CT-Agronegócio 029/2008) direcionado explicitamente ao “melhoramento convencional”, como se fosse necessário defender esta ciência contra a competição predatória da biotecnologia. Este tipo de edital somente contribui para acentuar a divisão entre as duas disciplinas. Ao invés de defendermos o melhoramento clássico como se fosse uma relíquia histórica, precisamos de um sistema de avaliação de propostas de pesquisa capaz de identificar quando o uso de marcadores moleculares se justifica, e quando está sendo inserido apenas para tornar a proposta mais “sexy”.

A reversão desta situação exigirá a formação de verdadeiras equipes multidisciplinares, que incluam especialistas em bioquímica, biologia molecular, fisiologia, recursos genéticos, bioinformática, estatística, genética de populações, genética quantitativa, melhoramento e talvez outras disciplinas. Hoje, nenhuma instituição brasileira, isoladamente, conta com uma equipe de tal ecletismo, dedicada exclusivamente ao arroz. Portanto, faz-se necessária a união de esforços de todas as instituições que atuam em genética e melhoramento de arroz no Brasil, com o objetivo claro de gerar conhecimento e ferramentas úteis para o desenvolvimento de cultivares de arroz mais eficientes. Além disso, é importante que esta equipe mantenha estreito contato com a comunidade científica internacional, trocando informações e agregando competências.

Existe na comunidade científica grande expectativa de que a biotecnologia venha a oferecer alternativas para o melhoramento de plantas para estresses, que reduza a necessidade de submeter as plantas aos estresses para seleção direta. Os métodos clássicos de melhoramento, tão eficientes para a obtenção de ganhos para ambientes favoráveis, apresentam sérias limitações para o melhoramento para ambientes desfavoráveis. Entre estas limitações, podem-se citar i) dificuldade experimental em simular, em ambiente controlado, situações de estresse semelhantes às encontradas pelas plantas no campo; ii) diferenças quanto à intensidade e ao momento de ocorrência dos eventos de estresse a que são submetidos os experimentos de campo a cada ano, o que pode levar à seleção de diferentes genótipos;

iii) interferência das diferenças de ciclos do plantio ao florescimento na resposta dos materiais aos estresses, dificultando a identificação de diferenças devidas a mecanismos morfo-fisiológicos; iv) maior erro experimental dos ensaios sob estresse, reduzindo a herdabilidade e a resposta à seleção. Por outro lado, o desenvolvimento de ferramentas moleculares eficientes para a seleção indireta passa necessariamente pela fenotipagem e, portanto, encontra as mesmas dificuldades mencionadas acima. Considerando a complexidade do problema, podemos afirmar que se melhoristas e biotecnólogos brasileiros continuarem a trabalhar separadamente, os programas de melhoramento de arroz do Brasil não serão capazes de desenvolver cultivares significativamente mais tolerantes a estresses abióticos, ficando na inteira dependência de inovações introduzidas de outros países para garantir a sua sustentabilidade.

PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES

A comunidade científica focada em genética e melhoramento de arroz no Brasil é pequena e desarticulada. Ainda persiste a separação entre melhoristas, focados no desenvolvimento de cultivares, e biotecnólogos, voltados para trabalhos acadêmicos. Agregar estes dois grupos, mais uma série de competências críticas em diversas áreas complementares, será essencial para alinhar a biotecnologia brasileira em arroz aos grupos líderes mundiais.

A biotecnologia não deve ser vista como uma alternativa ao melhoramento, ou uma competidora por recursos, mas sim como uma parte integrante desta ciência, que tira proveito do estágio atual do conhecimento científico humano para atingir objetivos concretos. Se os resultados práticos ainda estão aquém da expectativa inicial, talvez seja porque a complexidade biológica tenha sido subestimada nos primeiros anos da era molecular, mas isto não deve ser motivo para a rejeição destas tecnologias. Por outro lado, a biotecnologia de plantas não pode justificar-se a si mesma, deve buscar sempre a entrega de resultados práticos via cultivares melhoradas.

Todas as armas serão necessárias ao melhoramento genético do arroz para alcançar o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes aos estresses abióticos, por isso não se pode prescindir da biotecnologia. Entretanto, a genética também tem seus limites, e não se deve pensar que o melhoramento irá compensar todos os efeitos de uma mudança climática extrema, ou da degradação do solo e da água. Quanto mais se preservar o meio-ambiente agrícola, mais facilmente o melhoramento cumprirá sua tarefa de desenvolver cultivares que consigam tirar o máximo proveito dele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIE, T. et al. Construção de uma coleção nuclear de arroz para o Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, n. 2, p. 129-136, fev. 2005.
- BORBA T. C. O. et al. Microsatellite marker-mediated analysis of the Embrapa Rice Core Collection genetic diversity. **Genetica**. (aceito para publicação).
- BRESEGHELLO, F.; SORRELLS, M. E. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 3, p. 1323-1330, May/June 2006.
- BRONDANI, C. et al. Determination of genetic variability of traditional varieties of Brazilian rice using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 676-684, 2006.
- BRONDANI, C. et al. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, n. 6/7, p. 1192-1203, May 2002.
- BRONDANI, R. P. V. et al. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. **Genetica**, The Hague, v. 125, n. 2/3, p. 115-123, Nov. 2005.
- BUSO, G. S. C.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 107-117, 1998.
- FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 357-374, 2003.

- GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 5, p. 1971-1974, Mar. 1998.
- GOFF, S. A. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 92-100, Apr. 2002.
- PESSOA-FILHO, M. et al. A set of multiplex panels of microsatellite markers for rapid molecular characterization of rice accessions. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 23, may 2007.
- RABELLO, A. R. et al. Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L). **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 485, out. 2008.
- RANGEL, P. N. et al. Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the interspecific cross *Oryza sativa* (BG90-2) x *Oryza glumaepatula* (RS-16). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 1, p. 184-195, 2008.
- REMYINGTON, D. L. et al. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 20, p. 11479-11484, Sept. 2001.
- TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, p. 205-233, 1993.
- VAUGHAN, D. A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 2, p. 139-146, Apr. 2003.
- XU, K. N.; MACKILL, D. J. A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 3, p. 219-224, 1996.
- XU, K. et al. A high-resolution linkage map of the vicinity of the rice submergence tolerance locus Sub1. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 263, n. 4, p. 681-689, May 2000.
- XU, K. et al. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature**, London, v. 442, n. 7103, p. 705-708, Aug. 2006.
- XU, K.N.; DEB, R.; MACKILL, D. J. A Microsatellite marker and a codominant PCR-based marker for marker-assisted selection of submergence tolerance in rice. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 1, p. 248-253, Jan./Feb. 2004.
- YU, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, Washington, v. 296, n. 5565, p. 79-92, Apr. 2002.
- YU, J. M. et al. Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. **Genetics**, Maryland, v. 178, n. 1, p. 539-551, Jan. 2008.
- YU, J. M. et al. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nature Genetics**, New York, v. 38, n. 2, p. 203-208, Feb. 2006.

