

# VARIABILIDADE FENOTÍPICA E MOLECULAR EM GENÓTIPOS DE ARROZ COM DIFERENTES REAÇÕES AO FRIO

## PHENOTYPIC AND MOLECULAR VARIABILITY OF RICE GENOTYPES WITH DIFFERENT COLD REACTIONS

Renata Pereira da Cruz; Sandra Cristina Kothe Milach; Luiz Carlos Federizzi; Júlio César de Lima; Danielle Costenaro da Silva Serafim.

### RESUMO

A seleção assistida por marcadores moleculares para tolerância ao frio é de interesse em arroz devido às dificuldades de seleção em condições de campo e ao fato de que a tolerância varia conforme o período de desenvolvimento da planta. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a tolerância ao frio de seis genótipos de arroz em diferentes períodos de desenvolvimento, verificar as correlações entre estes períodos e identificar a população mais adequada para o mapeamento da tolerância ao frio com base no polimorfismo de marcadores RAPD e características fenotípicas. A tolerância ao frio foi avaliada nos períodos de germinação, vegetativo e reprodutivo por meio de dez características. Os resultados mostraram que os genótipos Japonica foram mais tolerantes ao frio que os Indica em todos os períodos de desenvolvimento estudados. As correlações fenotípicas variaram conforme a característica considerada e foram superiores quando elas diferenciaram genótipos tolerantes ao frio de genótipos sensíveis. Os coeficientes de Jaccard indicaram um baixo grau de similaridade entre os genótipos Japonica e os Indica, portanto com base nos marcadores RAPD qualquer cruzamento Japonica x Indica seria adequado para o mapeamento da tolerância ao frio. As características fenotípicas, em contraste, não separaram completamente os genótipos e, baseado nisso, a população mais divergente para o mapeamento da tolerância ao frio seria o cruzamento envolvendo o tolerante Quilla 64117 e o sensível IRGA 417.

*Palavras-chave:* Tolerância ao frio, estádios de desenvolvimento, *Oryza sativa* L., marcadores RAPD, mapeamento molecular.

### ABSTRACT

Marker assisted selection for cold tolerance is of high interest in rice due to the difficulties of selection under field conditions and to the fact that tolerance may vary according to the developmental stage of the plant. The aim of this study was to characterize rice cold tolerance at different periods of development in six rice genotypes, to determine the correlation between these periods and to identify the most adequate population for molecular mapping of cold tolerance based on the polymorphism of RAPD markers and phenotypic traits. Three genotypes belonged to the Japonica subspecies and the other three to the Indica one. Cold tolerance was evaluated at germination, vegetative and reproductive periods through measure of ten traits. Results showed that the Japonica genotypes were more cold tolerant than the Indica ones in all periods of development studied. Phenotypic correlations varied according to the evaluated trait and were higher when the traits differentiated cold tolerant from cold sensitive genotypes. Jaccard coefficients indicated a low degree of similarity between Japonica and Indica genotypes, so based on RAPD markers any Japonica x Indica cross would be suitable for cold tolerance mapping. Phenotypic traits, in contrast, did not separate completely the genotypes, and based on them, the most divergent population for cold tolerance mapping would be the cross involving the tolerant Quilla 64117 and the sensitive IRGA 417.

*Key words:* Chilling tolerance, stages of development, *Oryza sativa* L., RAPD markers, molecular mapping.

### INTRODUÇÃO

A tolerância ao frio em genótipos sulbrasilianos de arroz é importante devido à ocorrência de temperaturas baixas nos estádios iniciais e no período reprodutivo, as quais prejudicam o estabelecimento da lavoura e o rendimento de grãos, respectivamente (SOUZA, 1990). A seleção para tolerância ao frio é, no entanto, dificultada devido à complexa base genética do caráter (KHAN et al., 1986), aliada à falta de controle sobre o estresse em condições de campo. Além disso, a tolerância ao frio nas fases iniciais não foi correlacionada com a tolerância no período reprodutivo (LI et al., 1981; SHAHI & KHUSH, 1986; KAW, 1991), o que implica em selecionar para tolerância em cada período de desenvolvimento separadamente. Neste contexto, a associação de marcadores moleculares à tolerância ao frio seria extremamente útil para a seleção assistida desta característica, sem a necessidade da ocorrência do estresse e permitindo a avaliação de um grande número de indivíduos.

O mapeamento molecular da tolerância ao frio em arroz já permitiu a associação de marcadores de DNA à tolerância na fase reprodutiva (SAITO et al., 2001; TAKEUCHI et al., 2001; ANDAYA & MACKILL, 2003b; SAITO et al., 2003), vegetativa (QIAN et al., 2000; ANDAYA & MACKILL, 2003a) e de germinação (HOU et al., 2003; FUJINO et al., 2004; MIURA et al., 2004). Em todos estes estudos os marcadores mais utilizados foram os de RFLP (Random Fragment Length Polymorphism) e de SSR (Simple Sequence Repeats), sendo que em um deles os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) também foram utilizados. A vantagem dos dois primeiros é que são marcadores codominantes, porém os marcadores RFLP apresentam grau de polimorfismo inferior aos SSR e RAPD, os quais são obtidos de forma mais rápida por se basearem na reação de PCR (Polymerase Chain Reaction). Os marcadores SSR têm ainda a vantagem adicional de estarem associados a cromossomos específicos e, portanto, possibilitam o mapeamento físico da característica. No entanto, são de custo mais elevado para sua obtenção quando comparados aos RAPD. A facilidade, rapidez e o baixo custo aliado ao grau de polimorfismo gerado tornam os marcadores RAPD bastante úteis para o mapeamento de características de importância agrônômica e seleção assistida (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995), já tendo sido associados tanto à tolerância quanto à sensibilidade ao frio no período vegetativo do arroz e foram indicados para seleção assistida do caráter (KIM et al., 1999).

No processo de mapeamento, a escolha do gemoplasma a ser utilizado é fundamental, pois quanto maior for a distância genética entre os genitores que darão origem à população a ser mapeada, maior a chance de serem detectados polimorfismos ao nível de DNA (MILACH, 1998). Os marcadores RAPD se inserem muito bem para estes estudos preliminares de polimorfismo, quando

(Recebido para Publicação em 07/11/2005, Aprovado em 22/08/2007)

R. Bras. Agrociência, Pelotas, v.13, n.4, p.424-431, out-dez, 2007

objetivo é definir qual a população com maior divergência molecular para ser usada no mapeamento.

Neste sentido, este trabalho teve por objetivos caracterizar a reação ao frio de seis genótipos de arroz em três períodos de desenvolvimento, verificar a correlação entre estes períodos quanto à tolerância ao frio e identificar a população mais adequada para o mapeamento deste caráter em arroz por meio do polimorfismo existente entre os seis genótipos quanto a marcadores RAPD e características fenotípicas de tolerância ao frio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Seis genótipos de arroz, sendo três tolerantes ao frio e pertencentes à subespécie Japônica (Quilla 66304, Quilla 64117 e Diamante) e três sensíveis e pertencentes à subespécie Indica (IR 8, IRGA 417 e BRS 7), foram caracterizados fenotípica e molecularmente. A caracterização dos genótipos quanto à tolerância ao frio foi feita sob condições de temperatura controlada em três períodos de desenvolvimento por meio de experimentos conduzidos independentemente e relatados na seqüência. Os experimentos conduzidos no período de germinação foram realizados no Laboratório de Sementes do Departamento de Plantas de Lavoura, UFRGS, e os experimentos conduzidos nos períodos vegetativo e reprodutivo foram realizados na casa-de-vegetação e sala climatizada do IRGA, em Cachoeirinha, RS.

### Caracterização fenotípica no período de germinação Experimento I

Neste experimento, os seis genótipos de arroz foram submetidos à germinação sob duas condições: 13°C por 28 dias (frio) e 28°C por sete dias (controle). As sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos, sendo após lavadas seis vezes com água destilada estéril. Foram, então, colocadas em placas de Petri contendo papel germinador umedecido com água destilada e 1 mL de Benomil 2,5 ppm para evitar contaminação. O experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados com três repetições, sendo os blocos constituídos por diferentes prateleiras na câmara de germinação. Foram colocadas 20 sementes por placa de Petri, constituindo a média desta placa uma repetição, num total de 60 sementes por genótipo. Após cada período de germinação (frio e controle), o comprimento do coleóptilo das sementes foi medido, em mm, e a avaliação da tolerância ao frio foi feita por meio da porcentagem de redução no comprimento do coleóptilo (REDCOL), obtida comparando-se os dados do tratamento de frio com os dados na condição controle, pela fórmula:  $REDCOL (\%) = [(comprimento\ do\ coleóptilo\ no\ frio \times 100) / comprimento\ do\ coleóptilo\ no\ controle] - 100$ , onde o comprimento do coleóptilo é a média das 20 sementes avaliadas por repetição por genótipo.

### Experimento II

Neste experimento, os seis genótipos de arroz foram submetidos à germinação sob temperatura variável tendo sido utilizado: 28°C por 72 horas, 13°C por 96 horas (frio) e novamente 28°C por mais 72 horas, o que permitiu dar condições iniciais ótimas de germinação a todos os genótipos, seguida por um período curto de frio e novamente temperatura favorável à germinação. A desinfestação das sementes e a condução do experimento foram feitos

conforme o experimento I. O comprimento do coleóptilo foi medido em duas ocasiões: após o período de 96 horas a 13°C (comprimento 1) e após o segundo período de 72 horas a 28°C (comprimento 2). A avaliação da tolerância ao frio foi feita através do recrescimento do coleóptilo (RECRCOL), em mm, que consistiu na diferença entre a segunda e a primeira medições, ou seja, na capacidade de crescimento do coleóptilo após o período de frio, de acordo com a fórmula:  $RECRCOL (mm) = (comprimento\ 2) - (comprimento\ 1)$ , onde o comprimento do coleóptilo é a média das 20 sementes avaliadas por repetição por genótipo.

### Caracterização fenotípica no período vegetativo

Os seis genótipos de arroz foram semeados em baldes de 19,5 cm de altura por 16 cm de diâmetro contendo solo coletado no campo e adubado com 2 g da fórmula 2-20-20. Foram utilizados dois baldes por genótipo com três plantas por balde, as quais foram mantidas em casa-de-vegetação. A adubação nitrogenada foi feita 40 dias após a emergência das plantas, utilizando-se 2 g de uréia (45% N) por balde. Quando estavam com seis folhas, metade das plantas de cada genótipo foi submetida à temperatura de 15°C por 12 dias (frio) em sala climatizada com fotoperíodo de 12 horas e a outra metade permaneceu na casa-de-vegetação (controle). A radiação utilizada na sala climatizada foi constituída por lâmpadas fluorescentes e incandescentes e estava em torno de 112.300 lux, o que corresponde a 1517,7  $\mu mol\ s^{-1}\ m^{-2}$ . Diferenças de intensidade e qualidade de luz entre a sala climatizada e a casa-de-vegetação constituíram uma variável não controlada.

As plantas foram avaliadas quanto à estatura e grau de amarelecimento das folhas após o período de frio (data 1) e novamente após sete dias de temperatura normal (28°C) na sala climatizada (data 2). Nestas mesmas ocasiões, também foram avaliadas a estatura e o amarelecimento das folhas das plantas mantidas na casa-de-vegetação. A estatura foi avaliada medindo-se a distância da base da planta até a ponta da folha mais longa, em cm. O grau de amarelecimento foi avaliado por meio de leituras com aparelho clorofilômetro, as quais foram realizadas na base, meio e ápice da 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> folhas de cada planta. Cada repetição foi constituída pela média das três folhas de cada planta, as quais foram obtidas a partir da média das três leituras de cada folha (valor médio clorofilômetro). Cada planta foi considerada uma repetição, de forma que para cada genótipo se teve três repetições na condição de frio e três na condição controle. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado.

A tolerância ao frio no período vegetativo foi obtida pela comparação das avaliações realizadas na situação de frio com o controle e expressa como a porcentagem de redução na clorofila (REDCLO) e na estatura das plantas (REDEST) nas datas 1 e 2, de acordo com as fórmulas:

$REDCLOD1 (\%) = [(valor\ médio\ clorofilômetro\ no\ tratamento\ de\ frio\ na\ data\ 1 \times 100) / valor\ médio\ clorofilômetro\ no\ tratamento\ controle\ na\ data\ 1] - 100$

$REDCLOD2 (\%) = [(valor\ médio\ clorofilômetro\ no\ tratamento\ de\ frio\ na\ data\ 2 \times 100) / valor\ médio\ clorofilômetro\ no\ tratamento\ controle\ na\ data\ 2] - 100$

$REDESTD1 (\%) = [(estatura\ no\ tratamento\ de\ frio\ na\ data\ 1 \times 100) / estatura\ no\ tratamento\ controle\ na\ data\ 1] - 100$

$REDESTD2 (\%) = [(estatura\ no\ tratamento\ de\ frio\ na\ data\ 2 \times 100) / estatura\ no\ tratamento\ controle\ na\ data\ 2] - 100$

Caracterização fenotípica no período reprodutivo

O experimento foi instalado da mesma forma que para o período vegetativo, porém foram utilizados dez baldes para cada genótipo, num total de 30 plantas por genótipo. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, com um número variável de repetições, as quais corresponderam ao número de perfilhos avaliados. A reação ao frio dos genótipos no período reprodutivo foi avaliada em dois estádios, microsporogênese e antese, submetendo-se perfilhos nestes estádios a uma temperatura de 17°C por sete dias (frio). Para cada genótipo, algumas plantas foram mantidas permanentemente na casa-de-vegetação (controle).

O estágio de microsporogênese foi visualmente determinado através da distância entre as aurículas da folha bandeira e as da folha anterior, tendo sido utilizado um intervalo de -3 a +10 cm como indicativo deste estágio (SHIBATA, 1979). O estágio de antese foi considerado a partir do início da exposição da panícula e, no caso de haverem flores abertas, as mesmas foram manualmente eliminadas. Após o período de frio, as plantas foram levadas de volta à casa-de-vegetação onde permaneceram até à maturação. Neste estágio, as panículas dos perfilhos submetidos ao teste de frio e das plantas controle foram colhidas individualmente e posteriormente avaliadas quanto ao grau de exerceção e porcentagem de fertilidade de espiguetas.

O grau de exerceção da panícula foi tomado como a distância entre a lígula da folha bandeira e a base da panícula, em cm, sendo que valores positivos indicam exerceção completa da panícula (base da panícula acima da lígula da folha bandeira) e negativos exerceção incompleta (base da panícula abaixo da lígula da folha bandeira). A fertilidade de espiguetas foi obtida através da contagem do número de grãos cheios e vazios e expressa como porcentagem de grãos cheios sobre o número total de grãos da panícula. A tolerância ao frio no período reprodutivo foi expressa como porcentagem de redução na exerceção da panícula (REDEXER) e na fertilidade de espiguetas (REDFERT) nos estádios de microsporogênese e antese, obtida pela comparação do tratamento de frio com a situação controle, de acordo com as fórmulas:

REDEXERM (%) = [(exerceção da panícula no tratamento de frio na microsporogênese x 100)/ exerceção da panícula no tratamento controle] – 100

REDEXERA (%) = [(exerceção da panícula no tratamento de frio na antese x 100)/ exerceção da panícula no tratamento controle] – 100

REDFERM (%) = [(fertilidade de espiguetas no tratamento de frio na microsporogênese x 100)/ fertilidade de espiguetas no tratamento controle] – 100

REDFERTA (%) = [(fertilidade de espiguetas no tratamento de frio na antese x 100)/ fertilidade de espiguetas no tratamento controle] – 100

Caracterização molecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura, UFRGS. O DNA dos genótipos foi extraído conforme o protocolo de NELSON (1993), coletando-se em bulk folhas de uma planta jovem (três a quatro folhas) por genótipo. A verificação de polimorfismos ao nível de DNA foi feita pela técnica de RAPD, utilizando o seguinte protocolo para a reação de PCR: tampão Gibco BRL 1X, MgCl<sub>2</sub> [2,5mM], dNTPmix [0,2mM], 25 ng de primer, 1U de Taq polimerase (*Thermus aquaticus* Gibco BRL) e 20 ng de DNA genômico em 13 µL de volume final completado com água milliQ estéril. A amplificação do DNA foi feita em termociclador MJ Research utilizando o seguinte programa: 94°C por 4', seguido de 45 ciclos de 94°C por 30" (desnaturação), 37°C por 30" (anelamento) e 72°C por 66" (extensão) e um estágio final de 72°C por 7'. Os produtos de RAPD foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% com tampão TBE 0,5X e 0,192 µL mL<sup>-1</sup> de Brometo de Etídio. Foi utilizado DNA ladder 1Kb (Gibco Research Laboratories, BRL) como marcador de tamanho e os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados pelo sistema Kodak Digital Science.

Foram testados 99 primers da OPERON, porém os resultados foram baseados em 74 primers que forneceram 161 bandas polimórficas e com intensidade confiável para análise (Tabela 1). Estes 161 marcadores são resultado de duas reações de PCR, ou seja, para cada primer que produziu bandas polimórficas foram realizadas duas reações de PCR para confirmar o polimorfismo, intensidade e repetibilidade da banda obtida.

Tabela 1. Primers (série e número) utilizados para a caracterização molecular de seis genótipos de arroz.

Série do primer	Número do primer
OPERON A	4, 9, 10, 12, 17 e 19
OPERON D	1, 2, 5, 8, 12, 15 e 19
OPERON E	1, 2, 4, 6, 9, 12, 14, 15, 17 e 20
OPERON L	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 18 e 20
OPERON M	2, 10, 11, 12, 13 e 18
OPERON P	1, 3, 4, 6, 7, 8, 13, 14, 17, 18 e 19
OPERON T	1, 2, 4, 6, 9, 16, 17 e 20
OPERON U	2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 17, 19 e 20

Análise estatística

Os dados relativos às características de tolerância ao frio avaliadas nos seis genótipos em três períodos de desenvolvimento foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. A associação entre os diferentes períodos de

desenvolvimento e entre características dentro de um mesmo período foi verificada através do cálculo dos coeficientes de correlação de Pearson. Estas análises foram realizadas no Programa SAS (Statistical Analysis System). Os dados fenotípicos também foram utilizados em uma análise de agrupamento para os seis genótipos de arroz, de

forma a identificar os mais divergentes e, assim, a população mais adequada para o mapeamento da tolerância ao frio. A partir dos dados médios dos seis genótipos para as dez características fenotípicas foi produzida uma matriz de correlação utilizando a função Simint do Programa NT-SYS, a qual foi utilizada para a análise de agrupamento feita pelo método UPGMA (Unweighted Pairgroup Arithmetic Average Clustering Method). Com os resultados desta análise foi construído um dendrograma, mostrando a proximidade relativa entre os genótipos quanto à reação ao frio nos períodos de desenvolvimento avaliados.

A partir dos dados moleculares foi realizada uma análise de agrupamento de forma a verificar quais os genótipos mais divergentes e, portanto, a população com maior grau de polimorfismo ao nível de DNA a ser utilizada no mapeamento da tolerância ao frio em arroz. Para isto, os resultados das análises de RAPD foram computados como 1

(presença de banda) e 0 (ausência de banda), constituindo uma matriz de dados binários relativa aos seis genótipos e 161 marcadores. A similaridade dos genótipos a partir desta matriz de dados foi feita pelo cálculo do coeficiente de Jaccard, utilizando a função Simqual do Programa NT-SYS. A partir da matriz de similaridade produzida foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA e construído o dendrograma.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seis genótipos de arroz diferiram significativamente entre si para as dez características estudadas (Tabelas 2 e 3), indicando a existência de variabilidade para tolerância ao frio nos três períodos de desenvolvimento.

Tabela 2. Médias das características porcentagem de redução no comprimento do coleóptilo (Redcol), recrescimento do coleóptilo (Recrcol), porcentagem de redução na clorofila nas datas 1 e 2 (Redclod1 e Redclod2) e de redução na estatura nas datas 1 e 2 (Redestd1 e Redestd2) em seis genótipos de arroz.

Genótipo	Germinação		Período vegetativo			
	Redcol	Recrcol	Redclod1	Redclod2	Redestd1	Redestd2
BRS 7	38 a	9 b	36 a	38 b	14 ab	13 ab
IRGA 417	32 a	10 b	31 a	55 a	11 ab	4 b
IR 8	43 a	15 b	29 a	37 b	10 ab	8 b
Diamante	11 b	28 a	16 b	20 c	22 a	22 a
Quilla 66304	31 a	28 a	13 b	8 c	2 b	7 b
Quilla 64117	15 b	26 a	7 b	9 c	3 b	3 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha=0,05$ )

Tabela 3. Médias das características porcentagem de redução na exerceção e na fertilidade de espiguetas na antese (Redexera e Redferta) e na microsporogênese (Redexerm e Redferm) em seis genótipos de arroz.

Genótipo	Período reprodutivo			
	Microsporogênese		Antese	
	Redexerm	Redferm	Redexera	Redferta
BRS 7	12 b	95 a	243 b	99 a
IRGA 417	14 b	67 c	125 d	99 a
IR 8	443 a	82 b	649 a	87 b
Diamante	11 b	6 d	162 c	46 c
Quilla 66304	9 b	2 d	139 cd	52 c
Quilla 64117	50 b	14 d	1 e	11 d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha=0,05$ )

Cabe salientar que quanto maior o recrescimento do coleóptilo e menor a redução nas outras características avaliadas, maior é a tolerância ao frio do genótipo. Considerando o conjunto de características, pode-se observar que, de forma geral, os genótipos Japônica foram mais tolerantes ao frio que os genótipos Indica, o que concorda com relatos anteriores (LI et al., 1981; SHAHI & KHUSH, 1986). No entanto, a tolerância e sensibilidade dos genótipos dentro de cada subespécie variou conforme a característica considerada. No caso dos genótipos Japônica, por exemplo, observou-se que o genótipo Diamante foi o mais tolerante quanto à porcentagem de redução no comprimento do coleóptilo, enquanto que no período vegetativo foi o menos tolerante (Tabela 2).

As correlações entre as dez características estudadas foram obtidas com o objetivo de verificar a relação entre os diferentes períodos de desenvolvimento e entre as diferentes

características avaliadas em um mesmo período quanto à tolerância ao frio (Tabela 4).

As duas características avaliadas na germinação foram negativa e significativamente correlacionadas, porém a magnitude da correlação foi intermediária, indicando que a seleção para aumento do recrescimento do coleóptilo não implica necessariamente em diminuir a porcentagem de redução no comprimento do mesmo e vice-versa. A provável relação de cada uma destas características com diferentes mecanismos de tolerância ao frio na germinação já foi discutida (CRUZ & MILACH, 2004), o que explicaria a correlação intermediária entre as mesmas. Além disso, esta correlação deve ter relação com o comportamento do genótipo tolerante Quilla 66304 que, apesar de ter sido superior aos sensíveis quanto ao recrescimento do coleóptilo, não se diferenciou dos mesmos na porcentagem de redução no comprimento do coleóptilo (Tabela 2).

Tabela 4. Correlações de Pearson entre as características de tolerância ao frio avaliadas nos três períodos de desenvolvimento estudados.

	Características por período de desenvolvimento									
	Germinação					Reprodutivo				
	Vegetativo		Microsporogênese			Antese				
	Redcol	Recrcol	Redclod1	Redclod2	Redestd1	Redestd2	Redexerm	Redfertm	Redexera	Redferta
Redcol	1,00	-0,54*	0,59**	0,49*	-0,24	-0,29	0,47*	0,64**	0,61**	0,70**
Recrcol		1,00	-0,86**	-0,86**	-0,03	0,17	-0,16	-0,89**	-0,35	-0,83**
Redclod1			1,00	0,78**	0,28	0,06	0,19	0,82**	0,45*	0,87**
Redclod2				1,00	0,26	-0,07	0,18	0,81**	0,37	0,87**
Redestd1					1,00	0,76**	0,03	0,17	0,14	0,21
Redestd2						1,00	-0,07	-0,11	0,09	0,01
Redexerm							1,00	0,39	0,87**	0,22
Redfertm								1,00	0,58**	0,83**
Redexera									1,00	0,52*
Redferta										1,00

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

No período vegetativo, a porcentagem de redução na clorofila não foi correlacionada com a redução na estatura em nenhuma das datas de avaliação (Tabela 4). Apesar de Smillie, apud POISSON et al. (1996) ter relatado que tanto a alongação como a coloração das folhas são afetadas pela temperatura baixa, conforme KANEDA & BEACHELL (1972) a diminuição na estatura e o amarelecimento foliar parecem ser características independentes. De fato, ao medir cada uma destas características, se está avaliando, indiretamente, processos fisiológicos distintos. No caso da porcentagem de redução na clorofila, são os danos ao sistema fotossintético que são avaliados e, ao medir a porcentagem de redução na estatura, é a diminuição na divisão e alongação celulares que é considerada. De forma geral, pode-se afirmar que, para os genótipos e condições de frio testadas, a temperatura baixa no período vegetativo teve maior influência sobre a coloração das folhas do que sobre a estatura das plantas (Tabela 2), sendo este efeito mais pronunciado na data 2, indicando que os danos ao sistema fotossintético das plantas aumentaram sob temperatura normal. Este resultado concorda com relatos da literatura de que o dano de frio se manifesta mais seriamente após a normalização da temperatura (Tajima et al., apud TAJIMA, 1995). Já no que se refere à redução na estatura, esta foi maior quando avaliada logo após o frio, na data 1 (Tabela 2), o que demonstra que durante o período de temperatura normal as plantas retomaram o crescimento. Isto está de acordo com o observado por Kondo, apud SALAHUDDIN & VERGARA (1974) de que apesar da temperatura baixa inibir a alongação da lâmina e bainha da folha, as plantas podem crescer normalmente após um período de temperatura baixa.

No período reprodutivo, a correlação da porcentagem de redução na exerceção da panícula com a redução na

fertilidade de espiguetas foi significativa apenas no estágio de antese (Tabela 4), comprovando que o efeito do frio sobre a exerceção da panícula é maior na antese que na microsporogênese. O estágio de antese, por corresponder ao momento da exerceção da panícula, é aquele onde se espera maior redução nesta característica, como foi de fato observado (Tabela 3). Porém, a magnitude das correlações não foi alta, indicando que a diminuição na fertilidade de espiguetas, apesar de sofrer influência da exerceção da panícula (CHUNG, 1979), resultou em grande parte dos efeitos diretos do frio sobre os processos fisiológicos relacionados à formação dos grãos de pólen.

No que se refere às correlações entre os diferentes períodos de desenvolvimento, observou-se que elas variaram conforme a característica considerada (Tabela 4). Assim, as maiores correlações foram observadas entre as características que diferenciaram nitidamente os três genótipos tolerantes dos três sensíveis, como recrescimento do coleóptilo (Tabela 2), redução na clorofila (Tabela 2) e redução na fertilidade de espiguetas (Tabela 3).

Pelos resultados obtidos foi possível verificar que os genótipos Japônica são superiores aos Indica quanto à tolerância ao frio nos três períodos de desenvolvimento, o que concorda com a literatura de que, em geral, a tolerância ao frio é maior na subespécie Japônica que na Indica (LI et al., 1981). Porém, para tomar a decisão de qual população Indica x Japônica é mais adequada para o mapeamento da tolerância ao frio é fundamental avaliar também o polimorfismo ao nível de DNA, ou seja, a variabilidade molecular entre os genótipos. Assim, com os dados relativos a 161 marcadores de RAPD foi obtida uma matriz de similaridade (Tabela 5) a partir da qual foi realizada a análise de agrupamento dos genótipos (Figura 1).

Tabela 5. Matriz de similaridade (índice de Jaccard) entre seis genótipos de arroz obtida a partir de dados de 161 marcadores RAPD.

	IRGA 417	BRS 7	IR 8	Quilla 66304	Quilla 64117	Diamante
IRGA 417	1,00	0,66	0,58	0,12	0,09	0,10
BRS 7		1,00	0,76	0,10	0,09	0,09
IR 8			1,00	0,09	0,11	0,09
Quilla 66304				1,00	0,68	0,74
Quilla 64117					1,00	0,81
Diamante						1,00

A similaridade entre os genótipos tolerantes e sensíveis estudados com base no índice de Jaccard foi mínima (Tabela 5 e Figura 1), indicando que qualquer cruzamento Indica x Japônica, neste caso, pode ser utilizado para o desenvolvimento da população a ser mapeada no que diz respeito à diversidade molecular. ZHU et al. (1993) também observaram um elevado polimorfismo ao construírem um mapa molecular a partir de uma população proveniente de um cruzamento Indica x Japônica. De fato, o alto grau de polimorfismo observado nos cruzamentos intersubespecíficos em arroz faz com que sejam muito utilizados para a associação de marcadores moleculares a características de importância agrônômica (YANAGIHARA et al., 1995; XIAO et al., 1995; REDOÑA & MACKILL, 1996).

Além disso, apresentam a vantagem adicional de que, por não envolverem espécies silvestres, têm aplicação mais direta nos programas de melhoramento. No presente caso, o polimorfismo entre os genótipos Indica e Japônica estudados foi detectado com base em marcadores RAPD, os quais já haviam sido indicados para diferenciar estas subespécies devido ao seu alto grau de polimorfismo (CRUZ et al., 2003). Apesar dos marcadores SSR serem mais indicados para estudos de mapeamento, neste trabalho optou-se por utilizar marcadores RAPD pelo seu baixo custo e rapidez de obtenção, uma vez que o objetivo era apenas verificar o grau de divergência molecular a nível preliminar e não necessariamente testar marcadores para uso no mapeamento propriamente dito.

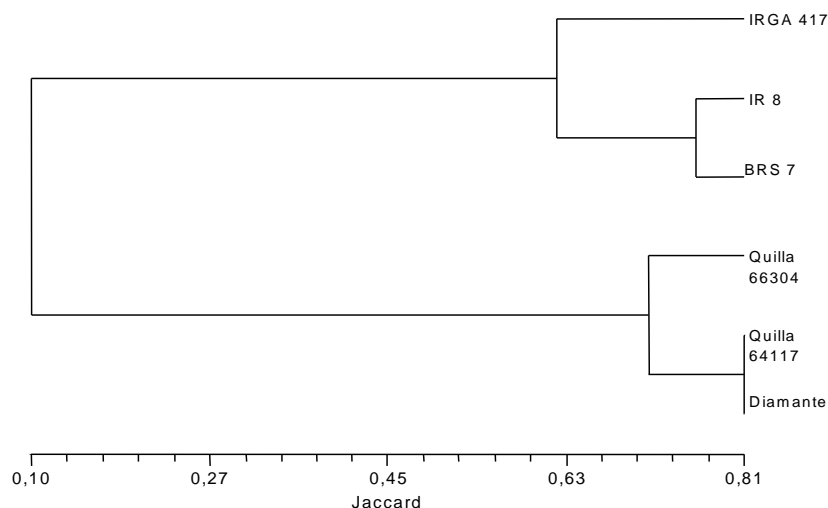


Figura 1. Dendrograma de seis genótipos de arroz baseado no índice de Jaccard obtido a partir de 161 marcadores RAPD.

Para a verificação da diversidade fenotípica, ou seja, quais os genótipos que apresentam fenótipos extremos para as características a serem mapeadas, foram utilizados os dados médios dos seis genótipos para as dez características

estudadas para a obtenção de uma matriz de correlação (Tabela 6), a partir da qual foi feita a análise de agrupamento (Figura 2).

Tabela 6. Matriz de correlação entre seis genótipos de arroz obtida com base em dez características de tolerância ao frio avaliadas nos períodos de germinação, vegetativo e reprodutivo.

	IRGA 417	BRS 7	IR 8	Quilla 66304	Quilla 64117	Diamante
IRGA 417	1,00	0,85	0,39	0,72	-0,24	0,63
BRS 7		1,00	0,77	0,86	-0,22	0,88
IR 8			1,00	0,68	0,14	0,82
Quilla 66304				1,00	-0,26	0,94
Quilla 64117					1,00	-0,27
Diamante						1,00

No agrupamento feito com base nos dados fenotípicos (Figura 2) não foi observada uma diferenciação tão clara entre os genótipos Indica e Japônica como aquela obtida pelo agrupamento molecular (Figura 1). A exceção foi o genótipo Quilla 64117, que se mostrou extremamente divergente em relação aos demais sendo, portanto, o mais indicado como genitor tolerante da população de mapeamento. Entre os genótipos Indica estudados, o IRGA

417 foi o mais divergente em relação aos demais e seria, portanto, o mais adequado como genitor sensível (Figura 2).

Observa-se, portanto que, apesar dos dados moleculares indicarem que qualquer população Indica x Japônica poderia ser utilizada no mapeamento da tolerância ao frio em arroz devido ao alto polimorfismo existente entre os grupos (Figura 1), os dados fenotípicos foram fundamentais para a escolha adequada dos genótipos genitores, demonstrando sua importância neste sentido.

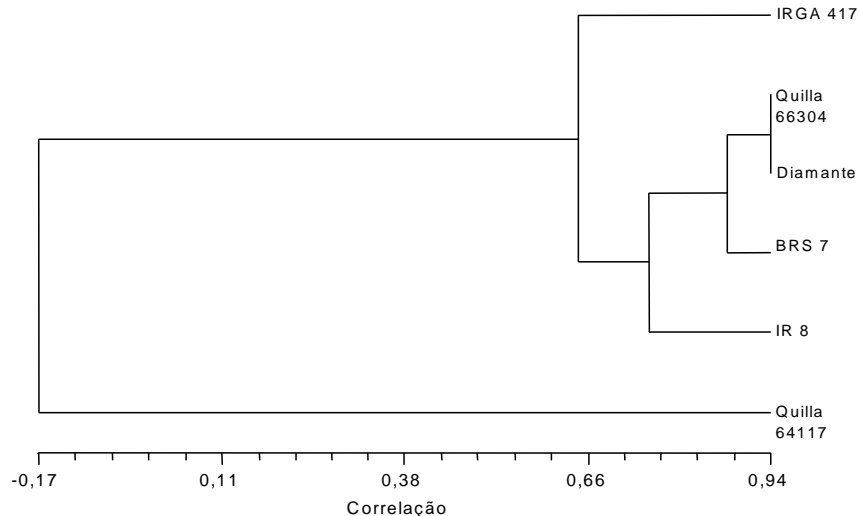


Figura 2. Dendrograma de seis genótipos de arroz baseado na correlação obtida a partir de 12 características de tolerância ao frio.

Cabe salientar que isto só foi possível após a análise de agrupamento feita (Figura 2), a qual evidenciou qual a combinação Indica x Japônica mais divergente em termos fenotípicos para o mapeamento. Deve ser lembrado, porém, que este agrupamento foi feito com base no conjunto das características avaliadas e, por isso, indica a melhor população se o objetivo for o mapeamento da tolerância ao frio nos três períodos estudados. O genótipo Quilla 64117 destacou-se pela tolerância ao frio nos três períodos avaliados, mas foi provavelmente seu comportamento superior aos demais genótipos Japônica no período reprodutivo a causa do resultado observado (Tabelas 2 e 3). Assim, se o objetivo for o mapeamento da tolerância ao frio em apenas um dos períodos de desenvolvimento, deve-se realizar uma nova análise de agrupamento com base apenas nos dados fenotípicos relativos àquele período e, assim, a população mais adequada pode vir a ser outra.

## CONCLUSÕES

Os genótipos Diamante, Quilla 66304 e Quilla 64117 são tolerantes ao frio nos três períodos de desenvolvimento estudados e os genótipos IRGA 417, BRS 7 e IR 8 são sensíveis.

Os períodos de desenvolvimento avaliados são correlacionados quanto à tolerância ao frio quando esta foi avaliada por meio do crescimento do coleóptilo (germinação), redução na clorofila (vegetativo) e redução na fertilidade de espiguetas (reprodutivo).

A população mais indicada para o mapeamento da tolerância ao frio, considerando-se todas as características

fenotípicas simultaneamente, é a que envolve o genótipo sensível IRGA 417 e o tolerante Quilla 64117.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, n.392, p.2579-2585, nov. 2003a.
- ANDAYA, V.C.; MACKILL, D.J. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica* x *indica* cross. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.106, n.6, p.1084-1090, abr. 2003b.
- CHUNG, G.S. The rice cold tolerance program in Korea. In: **Report of a rice cold tolerance workshop**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1979. p.7-19.
- CRUZ, R.P. da; LOPES, M.C.B.; MILACH, S.C.K. et al. Identifying RAPD markers to classify rice germplasm as indica or japonica. In: KHUSH, G.S.; BRAR, D.S.; HARDY, B. (Ed.) **Advances in rice genetics**. Supplement to Rice genetics IV. Los Baños: International Rice Research Institute, 2003. p. 160-162.
- CRUZ, R.P. da; MILACH, S.C.K. 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, jan./fev. 2004.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- FUJINO, K.; SEKIGUCHI, H.; SATO, T. et al. Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability

- in rice (*Oryza sativa* L.) **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.108, n.5, p.794-799, mar. 2004.
- HOU, M.Y.; JIANG, L.; WANG, C.M. et al. Detection and analysis of QTLs for low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Rice Genetics Newsletter**, Mishima, v.20, p.52-54, dez. 2003.
- KANEDA, C.; BEACHELL, H.M. Resistance of Japonica x Indica breeding lines to low temperatures. In: **Rice breeding**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1972. p.541-545.
- KAW, R.N. Genetic parameters of cold tolerance in rice. **Indian Journal of Genetics**, New Delhi, v.51, n.1, p.59-65, fev. 1991.
- KHAN, D.R.; MACKILL, D.J.; VERGARA, B.S. Selection for tolerance to low temperature-induced spikelet sterility at anthesis in rice. **Crop Science**, Madison, v.26, n.4, p.694-698, jul./ago. 1986.
- KIM, K.M.; PARK, G.H.; KIM, J.H. et al. Selection of RAPD marker for growth of seedlings at low temperature in rice. **Molecules and Cells**, Seoul, v.9, n.3, p.265-269, jun. 1999.
- LI, T.G.; VISPERAS, R.M.; VERGARA, B.S. Correlation of cold tolerance at different growth stages in rice. **Acta Botanica Sinica**, Beijing, v.23, n.3, p.203-207, maio. 1981.
- MILACH, S.C.K. Mapeamento molecular de características de importância agrônômica. In: \_\_\_\_\_. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. p.67-73.
- MIURA, K.; LIN, S.Y.; ARAKI, H. et al. Genetical studies on germination of seed and seedling establishment for breeding of improved rice varieties suitable for direct seeding culture. **Journal of Agricultural Research Quarterly**, Tsukuba, v.38, n.1, p.1-5, jan. 2004.
- NELSON, J.C. DNA isolation from cereals. In: 1993 ITMI WHEAT MAPPING WORKSHOP, 1993, Ithaca. **Laboratory manual...** Ithaca: Cornell University, 1993. p.15-17.
- POISSON, C.; PUARD, M.; DECHANET, R. Improvement of cold tolerance in rainfed upland rice. In: UPLAND RICE RESEARCH IN PARTNERSHIP, 1996, Los Baños, **Proceedings...** Los Baños: International Rice Research Institute, 1996. p.222-230.
- QIAN, Q.; ZENG, D.; HE, P. et al. QTL analysis of the rice seedling cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between *indica* and *japonica* rice. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v.45, n.5, p.448-453, mar. 2000.
- REDOÑA, E.D.; MACKILL, D.J. Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, n.3-4, p.395-402, abr. 1996.
- SAITO, K.; MIURA, K.; NAGANO, K. et al. Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 and their association with anther length. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.103, n. 6-7, p.862-868, nov. 2001.
- SAITO, K.; MIURA, K.; HAYANO-SAITO, Y. et al. Analysis of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage of rice. **Journal of Agricultural Research Quarterly**, Tsukuba, v.37, n.1, p.1-5, jan.2003.
- SALAHUDDIN, A.B.M.; VERGARA, B.S. Criteria for screening rice cultivars resistant to low water temperature at seedling stage. **Sabao Journal**, Misima, v.7, n.2, p.151-156, set. 1974.
- SHAHI, B.B.; KHUSH, G.S. Genetic analysis of cold tolerance in rice. In: **Rice genetics**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1986. p.429-435.
- SHIBATA, M. Progress in breeding cold-tolerant rice in Japan. In: **Report of a rice cold tolerance workshop**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1979. p.21-24.
- SOUZA, P.R. Alguns aspectos da influência do clima temperado sobre a cultura do arroz irrigado, no sul do Brasil. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v.43, n.389, p.9-11. 1990.
- TAJIMA, K. Factors and mechanism of chilling injury. In: MATSUO, T.; KUMAZAWA, K., ISHII, R. et al. (Ed.) **Science of the rice plant: physiology**. Tokyo: Food and agriculture Policy Research Center, 1995. v.2, p.798-812.
- TAKEUCHI, Y.; HAYASAKA, H.; CHIBA, B. et al. Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate *Japonica* rice. **Breeding Science**, Tokyo, v.51, n.3, p.191-197, jul. 2001.
- XIAO, J.H.; LI, J.M.; YUAN, L.P. et al. Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers. **Genetics**, Austin, v.140, n.2, p.745-754, jun. 1995.
- YANAGIHARA, S.; MCCOUCH, S.R.; ISHIKAWA, K. et al. Molecular analysis of the inheritance of the S-5 locus, conferring wide compatibility in Indica/Japonica hybrids of rice (*O. sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.90, n.2, p.182-188, fev. 1995.
- ZHU, L.H.; CHEN, Y.; XU, Y.B. et al. Construction of a molecular map of rice and gene mapping using a double haploid population of a cross between Indica and Japonica varieties. **Rice Genetics Newsletter**, Mishima, v.10, p.132-135, dez. 1993.