

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

MAPEAMENTO DE QTLs PARA TOLERÂNCIA  
AO FRIO E CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA  
AGRONÔMICA EM ARROZ

Danielle Costenaro da Silva Serafim  
Bióloga/UPF

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos à obtenção do Grau de  
Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Plantas de lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Maio de 2003



*Ao meu querido marido, dedico este trabalho.  
Por todo o seu amor, carinho e compreensão  
em todos os dias da minha vida  
e principalmente por estar ao meu lado  
nos momentos mais difíceis.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida.

Aos meus pais pelos ensinamentos, amor e exemplo de vida. E por todo esforço dedicado na minha educação. Aos meus queridos irmãos, Daniel e Daiane, pelo amor, carinho e compreensão nos momentos da minha ausência. À minha família, todo o meu amor e carinho.

A professora Sandra Cristina Kothe Milach pela orientação, ensinamentos, apoio e amizade em todos os momentos do curso de mestrado e na elaboração deste trabalho.

A Renata Pereira da Cruz pela co-orientação deste trabalho e por ter acompanhado-o desde o início, em todas as etapas, dispondo de seu tempo e trabalho. Pela sua constante amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

A todos os professores pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

A Nelson e Maria Corinta pelo constante apoio e incentivo durante as etapas dos meus estudos, e por terem me acolhido sempre que precisei.

Ao Émerson Limberger, pela amizade, companheirismo e pela ajuda na execução e análise dos géis de poliacrilamida.

A Ana Beatriz Locatelli pelo auxílio nas análises finais, e por quem, embora tenhamos tido pouco tempo de convivência, tenho um grande carinho.

A Marta Martins Barbosa pela convivência e amizade durante o curso e pela colaboração nos momentos finais deste trabalho e nas análises do Mapmaker.

Ao Paulo Roberto da Silva, amigo e colega, pelo seu apoio, incentivo e amizade durante todo o curso de Mestrado.

A Tatiana Boff pela amizade e suas palavras de incentivo durante o período de execução do trabalho no laboratório.

Aos colegas de laboratório pela amizade e pelo apoio prestado ao longo deste trabalho: Cândida Raquel, Cícero, Cláudia Lemons, Émerson, Fábio, Fernanda, Fernando, Gustavo, Laize, Luis Marcelo, Mariângela, Marta, Michelle, Paulo Henrique, Paulo Roberto, Roberta, Roberto, Sérgio Silva, Tatiana Boff e Vinícius.

Aos colegas das tardes de estudo, Ana Beatriz, Cícero, Émerson Costa, Naylor, Paula, Paulo Roberto e Rúbia.

A todas os colegas do Departamento de Plantas de Lavoura, os quais pude conviver e trocar idéias durante o curso de Mestrado, em especial a Cândida Cabral, Caren, Cláudia Lange, Fabiane, Leo, Luis Henrique, Mara, Mário, Naracelis, Paulo Fagundes, Sérgio Lopes, Tatiana Fontoura e Tatiana Terra.

Ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), pelo apoio para realização deste trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Agronomia, em especial à secretária da Pós-graduação Marisa, e aos secretários do Departamento de Plantas de Lavoura, Alice e Alexandre, pela amizade e convivência.

E ao CNPq pelo apoio financeiro.

# MAPEAMENTO DE QTLs PARA TOLERÂNCIA AO FRIO E CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA EM ARROZ<sup>1</sup>

Autor: Danielle Costenaro da Silva Serafim

Orientadora: Sandra Cristina Kothe Milach

Co-orientadora: Renata Pereira da Cruz

## RESUMO

A temperatura baixa é um estresse comum na cultura do arroz em regiões temperadas, portanto a tolerância ao frio é uma característica altamente desejável em genótipos brasileiros de arroz cultivados no sul do país, onde as temperaturas baixas prejudicam o estabelecimento da lavoura e diminuem o rendimento de grãos. O mapeamento molecular é uma estratégia promissora para o estudo e compreensão de características com controle genético complexo, tais como a tolerância ao frio em arroz. Com base nisso, os objetivos deste trabalho foram estudar a herança e herdabilidade das características de tolerância ao frio e das características de importância agrônômica a serem mapeadas, desenvolver um mapa molecular a partir da população segregante F<sub>2</sub> proveniente do cruzamento IRGA 417 (Índica) x Quilla 66304 (Japônica) e identificar locos de características quantitativas (QTLs) para a tolerância ao frio no período de germinação e vegetativo e características agrônômicas que diferenciam estas duas subespécies. Por fim, investigar a possibilidade de obter indivíduos recombinantes com características agrônômicas desejáveis e tolerância ao frio em uma população F<sub>2</sub> do cruzamento entre IRGA 417 x Quilla 66304. As análises das distribuições de frequências da geração F<sub>2</sub> evidenciaram a dificuldade de estimar o número de genes que controlam as características analisadas, sendo que todas elas apresentaram distribuição contínua e segregação transgressiva em relação aos genitores. O mapa foi construído com base em oito marcadores SSR e 42 marcadores do tipo AFLP com uma densidade média de um marcador a cada 38,8 cM, sendo o comprimento total do mapa de 581,6 cM. Foram identificados cinco QTLs, sendo que um deles confere tolerância ao frio no período de germinação, e explica 15,9% da variação fenotípica deste caráter. Os outros quatro QTLs identificados foram para largura do grão (21,3%), esterilidade de espiguetas (61,6%), estatura das plantas (34,5%) e comprimento do grão (21,9%). A detecção de um QTL associado à tolerância ao frio no período de germinação, e outros quatro QTLs associados às demais características de importância agrônômica na população IRGA 417 x Quilla 66304, demonstra a viabilidade deste tipo de análise. Entretanto, um mapa de ligação enriquecido é necessário para permitir a detecção de outros QTLs associados às características estudadas. Plantas recombinantes com alto recrescimento de coleóptilo e outras características agrônômicas desejáveis foram encontradas, o que evidencia o potencial da população proveniente de IRGA 417 x Quilla 66304 para o melhoramento da tolerância ao frio de genótipos de arroz adaptados ao Sul do Brasil.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (68 p.) Maio de 2003.

# MAPPING OF QTLs TO CHILLING TOLERANCE AND AGRONOMIC IMPORTANT TRAIT IN RICE<sup>1</sup>

Author: Danielle Costenaro da Silva Serafim  
Advisers: Sandra Cristina Kothe Milach  
Renata Pereira da Cruz

## ABSTRACT

Low temperature is a common stress for the rice crop in temperate regions, so cold tolerance is a highly desirable trait in Brazilian rice genotypes cultivated in the Southern region, where chilling temperatures affect crop establishment and lower grain yield. Molecular mapping is a promising strategy for the study and comprehension of traits with a complex genetic control, such as rice cold tolerance. Based on this, the aims of this work were to study the inheritance and heritability of the cold tolerance traits and of the agronomic traits to be mapped, to develop a molecular map from a F<sub>2</sub> segregant population of the cross IRGA 417 (Indica) X Quilla 66304 (Japonica) and to identify quantitative trait loci (QTLs) for cold tolerance at the germination and vegetative periods and for agronomic traits that differentiate these two subspecies. Finally, to investigate the possibility of obtaining recombinant individuals with desirable agronomic characters and cold tolerance in the F<sub>2</sub> population of the cross IRGA 417 x Quilla 66304. Analyses of the frequency distributions of the F<sub>2</sub> generation evidenced the difficulties in estimating the number of genes that control the evaluated traits, and all of them showed continuous distribution and transgressive segregation in relation to the parents. The map was constructed based on eight SSR markers and 42 AFLP markers with an average density of one marker every 38.8 cM and a total length of 581.6 cM. Five QTLs were identified, one of them is related with cold tolerance at the germination period, and explains 15.9% of the phenotypic variation of this trait. The other four QTLs identified were related with grain width (21.3%), spikelet sterility (61.6%), plant height (34.5%) and grain length (21.9%). The detection of one QTL associated with cold tolerance at the germination period and of four other QTLs associated with the agronomic traits in the IRGA 417 x Quilla 66304 population demonstrates the feasibility of this type of analysis. However, an enriched linkage map is needed to allow detection of other QTLs associated with the studied traits. Recombinant plants with high coleoptile regrowth and other desirable agronomic traits were found, indicating that the population obtained from IRGA 417 x Quilla 66304 has potential for cold tolerance rice breeding of genotypes adapted to the Soluthern region of Brazil.

---

<sup>1</sup> Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (68p.) May, 2003.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. Arroz: história e importância econômica .....	4
2.2. Danos ocasionados pelas temperaturas baixas .....	5
2.3. Problemas do frio no Rio Grande do Sul .....	7
2.4. Genética da tolerância ao frio .....	8
2.5. Diferenças entre Índica e Japônica .....	10
2.6. Marcadores moleculares .....	11
2.6.1. Classes de marcadores moleculares .....	11
2.6.2. Aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento genético de arroz ..	14
2.7. Mapeamento molecular .....	15
2.7.1. Base teórica do mapeamento .....	15
2.7.2. Mapas genéticos de ligação em arroz .....	17
2.7.3. Mapeamento para tolerância ao frio em arroz .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1. Caracterização fenotípica dos genitores e da população F <sub>2</sub> quanto à tolerância a baixas temperaturas .....	21
3.1.1. Recrescimento do coleótilo .....	22
3.1.2. Crescimento de plântulas .....	23
3.2. Caracterização fenotípica dos genitores e da população F <sub>2</sub> quanto às características de planta e dos grãos .....	23
3.2.1. Estatura de planta .....	24
3.2.2. Grau de exerceção da panícula .....	24
3.2.3. Porcentagem de esterilidade de espiguetas .....	24
3.2.4. Características físicas dos grãos .....	25
3.3. Análise estatística .....	25
3.4. Construção do mapa molecular .....	27
3.4.1. Extração e quantificação do DNA .....	27
3.4.2. Marcadores SSR .....	28
3.4.3. Marcadores de AFLP .....	32
3.4.4. Análise dos dados moleculares .....	35
3.4.5. Construção do mapa genético .....	36
3.4.6. Detecção de QTLs para as características fenotípicas .....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1. Distribuições de frequência das características fenotípicas .....	37
4.2. Teste de Qui-quadrado .....	47
4.3. Estimativas de variâncias e herdabilidade .....	48



4.4. Construção do Mapa Molecular.....	50
4.5. Detecção de QTLs para as características avaliadas.....	56
5. CONCLUSÕES .....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## RELAÇÃO DE TABELAS

1. Locos de SSR utilizados na análise da população F <sub>2</sub> proveniente do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304, seqüência dos pares de <i>primers</i> , localização crossômica (CRM), tamanho dos alelos (TAM) no cultivar IR36 e temperatura de anelamento (TA). UFRGS, 2003. ....	29
2. Combinações de primers MseI/EcoRI utilizados para amplificação seletiva seguindo o protocolo de AFLP, para o mapeamento da população IRGA 417 x Quilla 66304. UFRGS, 2003. ....	34
3. Médias e desvio padrão de todas as características avaliadas para os genótipos de arroz utilizados como genitores da população IRGA 417 x Quilla 66304 e da população F <sub>2</sub> . UFRGS, 2003. ....	42
4. Variância fenotípica (VP), variância ambiental (VE), variância genética (VG) e herdabilidade no sentido amplo (h <sup>2</sup> a) para as características fenotípicas no cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304. UFRGS, 2003. ....	49
5. Número de marcadores utilizados para a construção do mapa por grupo de ligação, comprimento em cM e localização cromossômica dos grupos de ligação no mapa físico do arroz. UFRGS, 2003. ....	53
6. Locos quantitativos (QTLs) identificados na população F <sub>2</sub> proveniente do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304. UFRGS, 2003. ....	57

## RELAÇÃO DE FIGURAS

1. Distribuições de frequência para recrescimento do coleóptilo (mm), crescimento de plântulas (cm), estatura de plantas (cm), grau de exerceção da panícula (cm), esterilidade de espiguetas (%), comprimento do grão (mm), largura do grão (mm), relação comprimento/largura para o genótipo Quilla 66304 (P1), IRGA 417 (P2) e população F<sub>2</sub> (F2), UFRGS, 2003.....38
2. Mapa de ligação molecular de arroz baseado na população F<sub>2</sub> do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304. Distâncias no mapa são dadas em centiMorgans. LOD 6. QTLs são identificados por asterisco (\* - um QTL; \*\* - dois QTLs). UFRGS, 2003. ....54

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais cultivados mais importantes, constituindo-se no alimento básico da maior parte da população mundial. No Brasil, é um dos principais produtos que compõe a cesta básica e a principal fonte calórica entre os grãos. O consumo per capita de arroz está estimado em 45Kg/habitante/ano. A cultura é plantada em todo o território nacional, mas principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor nacional de arroz irrigado, contribuindo com mais de 40% da produção, sendo a maioria dos cultivares pertencentes à subespécie Índica.

Entre os problemas que podem influenciar o rendimento de grãos do arroz, destaca-se a sensibilidade a temperaturas baixas durante os diferentes períodos de desenvolvimento da cultura. Os cultivares da subespécie Índica são geralmente sensíveis ao frio e os da subespécie Japônica são classificados como tolerantes. Como a maioria dos cultivares utilizados no Brasil são da subespécie Índica, os produtores tem realizado algumas práticas culturais para minimizar os danos causados pelo frio. A semeadura antecipada é uma delas, onde o plantio ocorre nos meses de agosto e setembro na região Sul do Estado, evitando que o florescimento da cultura coincida com os meses de maior ocorrência de frio. Outra prática é a elevação da lâmina d'água, a qual é indicada durante o estágio de microsporogênese para proteger as plantas da variação da temperatura do ar entre o dia e a noite. No entanto, a ocorrência de temperaturas baixas durante os períodos

iniciais de desenvolvimento da cultura e as dificuldades relacionadas ao manejo da água de irrigação em grandes áreas fazem do desenvolvimento de cultivares tolerantes a temperaturas baixas a principal alternativa para o problema do frio na cultura do arroz. A obtenção de cultivares tolerantes ao frio nos períodos de germinação, vegetativo e reprodutivo é, portanto, fundamental para estabilizar a produção deste cereal no RS, onde períodos de temperaturas baixas são comuns ao longo do ciclo da cultura.

O melhoramento genético para a tolerância ao frio apresenta dificuldades relacionadas ao tipo de herança do caráter, que é de natureza quantitativa e altamente influenciado pelo ambiente e cuja seleção a campo tem baixa precisão pela instabilidade e imprevisibilidade da ocorrência do estresse.

O mapeamento de populações e a identificação de marcadores moleculares associados à tolerância ao frio podem auxiliar na compreensão das bases genéticas desta característica. A partir da construção de mapas moleculares é possível obter uma análise completa do genoma, além da localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância econômica e a utilização dessas informações para o melhoramento genético. A medida que mais marcadores associados a genes de interesse sejam encontrados, o uso de marcadores moleculares na seleção assistida será cada vez mais viável.

Nossa hipótese é de que várias regiões genômicas estão associadas à tolerância ao frio na população analisada, devido ao tipo de herança. Pelo fato de um grande número de marcadores terem sido utilizados em nosso estudo, estando distribuídos no genoma do arroz, nossa expectativa é detectar associações significativas entre os marcadores e genes para tolerância ao frio. Ainda, detectar diferentes regiões genômicas envolvidas na tolerância ao frio nos estádios de germinação e vegetativo, em função dessas características serem independentes geneticamente. Também, identificar regiões genômicas associadas a

outros caracteres de importância agrônômica em arroz. Por fim, que a população IRGA 417 x Quilla 66304 pode ser utilizada para o melhoramento da tolerância ao frio em arroz pelo Programa do Instituto Rio-grandense do Arroz (IRGA).

Nesse contexto, este trabalho teve os objetivos, descritos a seguir:

Gerais:

- Mapear genes para a tolerância ao frio e outros caracteres de importância agrônômica em arroz (*Oryza sativa* L.);
- Investigar o potencial de uma população proveniente de um cruzamento Índica x Japônica para transferência da tolerância ao frio para material genético do tipo Índica adaptado ao sul do Brasil.

Específicos:

- Estudar a herança e herdabilidade das características de tolerância ao frio e das características agrônômicas a serem mapeadas;
- Construir um mapa genético de ligação para a população F<sub>2</sub> proveniente do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304 com marcadores SSR e AFLP;
- Identificar locos de características quantitativas (QTLs) associados à tolerância ao frio nos períodos de germinação e vegetativo;
- Identificar locos de características quantitativas associadas a outras características de importância agrônômica em arroz;
- Investigar a possibilidade de obter indivíduos recombinantes com características agrônômicas desejáveis e tolerância ao frio em uma população F<sub>2</sub> do cruzamento entre IRGA 417 x Quilla 66304.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Arroz: história e importância econômica

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta cultivada pertencente ao gênero *Oryza*, tribo *Oryzaceae*, subfamília *Pooideae*, família *Poaceae*. O gênero *Oryza* é considerado o mais importante da tribo e compreende aproximadamente 22 espécies que estão distribuídas pelas regiões da Ásia, África, América do Sul e América Central. Dentre essas espécies apenas duas são cultivadas: *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* L., as quais são diplóides e constituídas pelo genoma AA, com número básico de cromossomos  $2n=24$  (Chang, 1996).

A origem do arroz ocorreu provavelmente na Índia, e a sua propagação na China data de mais de 3000 anos antes da era Cristã (Fornasieri Filho & Fornasieri, 1993). A espécie selvagem *Oryza rufipogon* é o ancestral mais provável de *Oryza sativa*, por ser uma espécie perene e de fecundação cruzada, e de onde deve ter se originado o hábito semi-aquático e perene dos genótipos de arroz cultivado (Chang, 1996).

A espécie *Oryza sativa* L. divide-se em duas subespécies denominadas Índica e Japônica. Os cultivares da subespécie Índica são predominantemente cultivados nos trópicos e subtropicais e os da subespécie Japônica em regiões temperadas. Essas subespécies são diferenciadas através de um conjunto de caracteres que abrangem desde aspectos morfológicos até reações a estresses abióticos como seca e frio. A maioria dos cultivares da subespécie Índica são geralmente sensíveis ao frio enquanto que os da subespécie Japônica são classificados como tolerantes a baixas temperaturas (Oka, 1958).

A classificação do arroz nessas duas subespécies é de grande importância para os melhoristas, pois ela indica a adaptação a ambientes específicos e dessa forma influencia nas estratégias de melhoramento para a utilização de germoplasma (Mackill et al., 1996).

O arroz é considerado um dos principais cereais cultivados no mundo, perdendo apenas em área cultivada para o milho e em produção de grãos para o trigo. No Brasil, o arroz é um dos cereais mais importantes que fazem parte da cesta básica e é também a principal fonte calórica, fornecendo de 12 a 35% de calorias e de 9 a 12% de proteínas (Fornasieri Filho & Fornasieri, 1993). O RS é considerado o maior produtor de arroz irrigado, contribuindo com mais de 40% da produção, sendo o rendimento médio em torno de 5 a 6 t/ha, apesar dos cultivares modernos lançados pela pesquisa apresentarem potencial acima de 10 t/ha (Azambuja et al., 1996). De forma geral, os cultivares pertencentes à subespécie Índica são sensíveis à ocorrência de temperaturas baixas, a qual contribui para a não expressão do potencial de rendimento dos genótipos. A temperatura crítica para a cultura no RS varia entre 10 a 18°C, causando prejuízos superiores a 25% no rendimento de grãos (Terres & Galli, 1985 apud Terres, 1991).

## **2.2. Danos ocasionados pelas temperaturas baixas**

As plantas de origem tropical como o arroz, são geralmente sensíveis aos danos causados por temperaturas baixas. O frio é um estresse limitante na cultura do arroz em diversas partes do mundo, principalmente em áreas temperadas e de altitudes elevadas (Bertin & Bouharmont, 1997). A temperatura ótima para a cultura encontra-se entre 25 a 30°C, e temperaturas inferiores a 20°C são consideradas prejudiciais (Yoshida, 1981b).

No período de germinação, os danos causados pelo frio são o atraso e diminuição na porcentagem de germinação. Durante o período vegetativo pode ocorrer atraso no desenvolvimento, redução na estatura e amarelecimento das folhas de plântulas jovens. E



no período reprodutivo ocorre má exerceção da panícula, esterilidade e manchas nas espiguetas (Souza, 1990).

Os estádios mais críticos quanto à ocorrência de temperaturas baixas para o arroz irrigado são a diferenciação da panícula, a formação do grão de pólen (microsporogênese) e a antese (florescimento). A microsporogênese ocorre aproximadamente de 10 a 15 dias antes da emissão da panícula e tanto neste estágio como durante o estágio de antese o maior dano causado pela ocorrência de frio é a esterilidade de espiguetas (Ferraz, 1987). No estágio de antese, a esterilidade é causada pela dificuldade de abertura das anteras ou do crescimento do tubo polínico devido às baixas temperaturas do ar, o que impede a fecundação. Já na microsporogênese, a esterilidade das espiguetas pode ser devida à inviabilidade do pólen causada pela ocorrência de frio quando o grão de pólen está sendo formado (Mackill et al., 1996). Este é o estágio considerado mais sensível ao frio na cultura do arroz (Yoshida, 1981b).

Alguns autores descreveram práticas para evitar ou minimizar a ocorrência de temperaturas baixas nos períodos críticos da cultura do arroz. Uma delas é a semeadura precoce, a qual permite que o florescimento ocorra mais cedo, quando as temperaturas ainda estão altas (Hamdani, 1979). Outra estratégia é a elevação da lâmina d'água, a qual visa minimizar os efeitos do frio durante a etapa de microsporogênese na panícula, levando em conta o efeito termo-regulador da água (Fornasier Filho & Fornasier, 1993).

Independente das práticas de manejo que possam ser adotadas, a obtenção de cultivares de arroz tolerantes ao frio é, sem dúvida, fundamental para evitar perdas de rendimento devido à ocorrência de temperaturas baixas.

Em países como a Austrália, China, Japão, Coréia, Nepal e Estados Unidos o problema do frio na cultura do arroz vem sendo estudado há muito tempo, e já foram estabelecidas estratégias a serem utilizadas em programas de melhoramento (Yoshida,

1981b). No entanto, o período de desenvolvimento da planta mais afetado pelo frio varia de país para país e de região para região, assim como o conseqüente dano observado, tornando o melhoramento para a tolerância ao frio em arroz extremamente dependente das condições locais (Cruz & Milach, 2000). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de programas de melhoramento específicos para cada país e região, devido à grande variabilidade existente em relação ao clima e solo.

### **2.3. Problemas do frio no Rio Grande do Sul**

No RS a época de semeadura da cultura ocorre geralmente nos meses de setembro a novembro e, em algumas regiões do Estado, a temperatura mínima média mensal no mês de outubro é de 12°C (Oliveira, 1997). A ocorrência dessas temperaturas baixas nos estádios iniciais pode causar sérios danos no estabelecimento da lavoura, diminuindo o estande inicial e favorecendo o estabelecimento de plantas daninhas (Cruz, 2001). No período reprodutivo do arroz, que ocorre geralmente nos meses de janeiro e fevereiro, a temperatura mínima média é de 18°C (Oliveira, 1997), a qual está abaixo da temperatura ótima para a cultura neste período que é de 25 a 30°C (Yoshida, 1981b). Como conseqüência observam-se efeitos diretos no rendimento de grãos devido ao aumento da esterilidade de espiguetas.

A duração e a intensidade do frio são muito variáveis e os prejuízos ocorrem nas lavouras em que o arroz está nos estádios de maior sensibilidade. Na safra de 1982/83, por exemplo, as perdas causadas pelas temperaturas baixas no RS, foram superiores a 20% da produção total de cada propriedade (Terres, 1991).

Além dos danos citados anteriormente, foi observado que em lavouras do RS as panículas afetadas pelo frio têm coloração mais clara ou pálida após a emergência e ficam gradativamente com as glumas escuras à medida que o tempo avança (Lopes, 2002b).

Segundo Steinmetz (1996), o frio na cultura do arroz é um elemento climático intimamente relacionado com o nível de rendimento aquém do potencial de rendimento dos genótipos. Por isso, a tolerância ao frio é uma característica altamente desejável em regiões como o RS, uma vez que temperaturas baixas ocorrem em diferentes épocas do ciclo da cultura. Além disso, é imprescindível o conhecimento das dificuldades existentes na busca por plantas tolerantes ao frio, e ainda, que se conheça a base genética da tolerância em todos os estádios de desenvolvimento da cultura.

#### **2.4. Genética da tolerância ao frio**

Há evidências de que a tolerância ao frio em diferentes estádios de desenvolvimento é controlada por genes que atuam independentemente nos períodos de germinação, vegetativo e reprodutivo (Bertin & Bouharmont, 1997). Assim a genética da tolerância ao frio tem sido estudada em cada período de desenvolvimento da planta separadamente. Os principais resultados obtidos são provenientes de estudos conduzidos sob condições controladas para que não haja interferência de nenhum outro fator nos resultados.

Os estudos relativos às bases genéticas da tolerância ao frio na germinação indicaram a ação de quatro ou mais genes dominantes envolvidos na capacidade de tolerância ao frio neste período (Sasaki et al., 1973 apud Sthapit & Witcombe, 1998; Sasaki, 1977 apud Takahashi, 1997). Chung (1979), por sua vez, identificou poucos genes atuando neste mesmo estágio. Em um estudo da capacidade combinatória para tolerância ao frio na germinação de seis genótipos de arroz, sendo três tolerantes (Quilla 64117, Quilla 66304 e Diamante) e três sensíveis (IRGA 417, BRS 7 e IR 8), Cruz (2001) concluiu que a porcentagem de redução no comprimento do coleóptilo e o recrescimento do mesmo sob temperatura baixa são herdáveis e tanto as ações gênicas aditivas quanto de dominância e epistasia são importantes na determinação da herança desses caracteres.

A herança de tolerância ao frio em arroz no período vegetativo, avaliada através da medição da estatura em plântulas submetidas a 8°C por 14 dias, evidenciou quatro a cinco genes responsáveis, com efeitos aditivos e de dominância envolvidos na expressão do caráter (Li & Rutger, 1980).

A tolerância ao frio no período reprodutivo foi medida pela exerceção completa da panícula no campo, a qual mostrou herança monogênica, condicionada por apenas um gene dominante (Pandey & Gupta, 1993). Cruz (2001) avaliou o comportamento da geração F<sub>2</sub> proveniente do cruzamento entre dois genitores sensíveis (BRS 7 e IRGA 417) e dois tolerantes (Diamante e Quilla 64117), tendo concluído que a exerceção completa da panícula nos genótipos tolerantes é governada por um gene recessivo e a herdabilidade é moderada.

A avaliação da porcentagem de esterilidade de espiguetas medida sob condições controladas, em plantas submetidas a 20°C por cinco dias no período de antese, indicou uma herança poligênica (Khan et al., 1986). Nagasawa et al. (1994) estimaram que quatro ou mais genes controlam a tolerância ao frio no período reprodutivo em cultivares da subespécie Japônica. Outros estudos têm apontado que a tolerância ao frio no período reprodutivo é de herança quantitativa (Andaya & Mackill, 2003) o que dificulta a seleção para a tolerância nesse período, que é o mais sensível e onde se observam maiores perdas no rendimento de grãos.

Os dados acima demonstram que num mesmo período de desenvolvimento diferentes resultados foram encontrados, isso se deve principalmente ao nível de estresse utilizado e às características avaliadas. Portanto, para que estudos deste tipo tenham aplicabilidade é importante que o nível de estresse seja definido (Datta & Siddiq, 1983). De maneira geral, a herança da tolerância ao frio nos diferentes períodos de desenvolvimento da cultura parece ser de origem poligênica, dificultando o melhoramento para essa característica.

O melhoramento para a tolerância ao frio em arroz no RS implica no uso de genótipos da subespécie Japônica como fonte de tolerância ao frio em cruzamentos com genótipos adaptados da subespécie Índica. No entanto, tem sido relatado um alto grau de esterilidade na geração F<sub>1</sub> destes cruzamentos, o que diminui o número de recombinantes obtidos e dificulta a transferência gênica entre essas duas subespécies (Cruz & Milach, 2000).

### **2.5. Diferenças entre Índica e Japônica**

Os cultivares de arroz pertencentes à subespécie Índica são predominantemente cultivados nos trópicos e subtropicais e os pertencentes à subespécie Japônica em regiões temperadas (Mackill, 1995; Mackill & Lei, 1997). Existe ainda uma terceira subespécie denominada Javânica, cujos genótipos são cultivados em planícies tropicais da Indonésia, no entanto, o trabalho realizado por Mackill (1995) mostrou que os genótipos dessa subespécie podem ser incluídos na subespécie Japônica, sendo considerados como Japônica tropical.

As subespécies Índica e Japônica são diferenciadas através de diversos fatores, que abrangem desde aspectos morfológicos até reações a estresses abióticos. As principais diferenças estão relacionadas à tolerância das plantas a baixas temperaturas, resistência à seca, acamamento em resposta a fertilizantes, habilidade competitiva com plantas vizinhas, germinação e taxa de crescimento em baixas temperaturas, longevidade da semente e eficiência fotossintética das folhas com o mesmo conteúdo de proteína (Mackill et al., 1996; Oka & Morishima, 1997).

Outras características, como a relação comprimento/largura dos grãos, são usadas para diferenciar as duas subespécies. Os cultivares da subespécie Índica apresentam grãos mais longos e finos e os da subespécie Japônica geralmente apresentam grãos largos

e curtos (Matsuo, 1997). No Brasil, a preferência se dá por grãos do tipo Índica, os quais são longos e finos.

Em estudo realizado por Lopes (2002a), as características que mais contribuíram para separar os genótipos da subespécie Índica e Japônica foram o ângulo da folha bandeira, comprimento do colmo, grau de exerceção da panícula e grau de degrane da panícula. Naquele trabalho, foram utilizados marcadores dos tipos RAPD e SSR e foi possível obter uma boa discriminação entre as subespécies Índica e Japônica com base nos marcadores moleculares.

Alta esterilidade de espiguetas tem sido observada freqüentemente em cruzamentos entre as subespécies Índica x Japônica, a qual tem sido apontada como sendo decorrente de causas genéticas (Oka & Morishima, 1997). Apesar das inúmeras diferenças entre as duas subespécies, na literatura foram citados apenas um a dois genes responsáveis pela esterilidade no cruzamento Índica x Japônica (Sano, 1997 apud Matsuo et al., 1997).

Apesar da alta esterilidade de espiguetas observada, as diferenças entre as subespécies indicam a existência de grande variabilidade genética para ser explorada, podendo se obter ganhos genéticos significativos em programas de melhoramento por meio de cruzamento entre as duas subespécies. Nesse contexto, a utilização de marcadores moleculares é uma ferramenta importante para a diferenciação das duas subespécies e para o entendimento das bases genéticas das características que as diferenciam (Lopes, 2002a).

## **2.6. Marcadores moleculares**

### **2.6.1. Classes de marcadores moleculares**

Existem vários tipos de marcadores em plantas, que podem ser empregados conforme o objetivo de cada trabalho. Os primeiros marcadores utilizados foram os morfológicos, no entanto, esses apresentam limitações quanto ao número restrito de

características a serem avaliadas, quanto ao número de marcadores identificados, entre outras. Em seguida surgiram os marcadores isoenzimáticos, ou bioquímicos, através dos quais foi possível a identificação de um maior número de marcadores em um maior número de genótipos. No entanto, esses marcadores apresentam muitas limitações, uma delas é que não conseguem abranger todo o genoma e apresentam um baixo nível de polimorfismo. Além disso, por serem produtos de genes, estão sujeitos à influência ambiental e dependem do estágio de desenvolvimento da planta (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Na tentativa de desenvolver técnicas mais vantajosas para a identificação de marcadores, surgiram os marcadores de DNA, os quais apresentam várias vantagens em relação aos demais, dentre elas a capacidade de maior cobertura do genoma, alto grau de polimorfismo, neutralização dos efeitos fenotípicos, não influenciados pelo estágio de desenvolvimento da planta (Milach, 1998).

A primeira técnica desenvolvida para a identificação de marcadores de DNA foi a de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), ou seja, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição. Nessa técnica o polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. A técnica de RFLP apresenta a vantagem de abranger todo o genoma (dependendo do tipo de biblioteca de sondas de DNA utilizadas) entretanto, apresenta algumas desvantagens, tais como, a inexistência de bibliotecas de sondas disponíveis em algumas espécies (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Na década de 80, foi desenvolvida a técnica de PCR (*Polimerase chain reaction*) (Mullis & Faloona, 1987), a qual possibilitou a elaboração de várias outras técnicas para identificação de marcadores baseados em PCR. Essa é uma técnica altamente eficiente, que

envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) a seqüências complementares na molécula de DNA, os quais delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificada e a extensão enzimática da mesma. Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação do DNA molde, anelamento dos *primers* e extensão das novas fitas de DNA. A facilidade, rapidez e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo (Milach, 1998).

Uma técnica baseada em PCR bastante utilizada atualmente é a SSR (*Simple sequence repeats*) ou Microsatélite, desenvolvida por Litt & Luty (1989). SSR são seqüências de um a quatro pares de bases repetidas e adjacentes, distribuídas no genoma. Nessa técnica são utilizados pares de *primers* específicos para amplificar as regiões de DNA repetitivo. A principal vantagem é o alto grau de polimorfismo, o que a torna a melhor opção na caracterização de cultivares e mapeamento genético (Milach, 1998). Uma desvantagem nesse tipo de marcador é que o desenvolvimento de *primers* para identificá-lo é um processo elaborado e caro, mas uma vez que estejam disponíveis a técnica se torna acessível.

Outra técnica bastante utilizada é o AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) (Vos et al., 1995) e está baseada na amplificação através da PCR de fragmentos gerados por enzimas de restrição específicas os quais são ligados a oligonucleotídeos adaptadores de poucas bases. Essa gera amplo número de bandas de fragmentos de restrição, facilitando a detecção de polimorfismos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Entre as vantagens da utilização de marcadores do tipo AFLP está o grande número de fragmentos que são produzidos e analisados em um único gel, cerca de 50 a 100



fragmentos de restrição amplificados. Entretanto, esses marcadores são ainda caros, já que as bandas geradas são detectadas por coloração com nitrato de prata, fluorescência ou radioatividade (Mohan et al., 1997).

### **2.6.2. Aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento genético de arroz**

De uma maneira geral o uso de marcadores de DNA em arroz vêm possibilitando o estudo da diversidade genética dentro da espécie (Zhu et al., 1998), a caracterização molecular de cultivares (Garland et al., 1999; Lopes, 2002a), a identificação de subespécies (Xu et al., 1998) e a construção de mapas altamente saturados para a identificação de características importantes agronomicamente (Causse et al., 1994; Mohan et al., 1997).

O uso de marcadores moleculares em arroz é uma ferramenta promissora para a seleção indireta da tolerância ao frio. Os marcadores de DNA já vem sendo usados em arroz para o mapeamento de caracteres relacionados ao rendimento (McCouch et al., 1988; Chen et al., 1997).

A utilização de SSR como marcadores tem sido ampla em mapeamento genético para algumas culturas anuais como a soja, arroz e trigo (Beckmann & Soller, 1990; Akkaya et al., 1992; Rafalski & Tingey, 1993; Mudge et al., 1997; Andaya & Mackill, 2003). Eles podem ser utilizados na construção de mapas de ligação por apresentarem alto grau de polimorfismo e em estudos de diversidade genética, uma vez que apresentam herança co-dominante distinguindo indivíduos heterozigotos de homozigotos (Milach, 1998). Em arroz, estudos recentes demonstraram que os marcadores de SSR estão distribuídos uniformemente pelo genoma e detectam um alto nível de polimorfismo em cultivares (Temnykh et al., 2000). Cerca de 500 pares de *primers* de SSR foram desenvolvidos para o gênero *Oryza* spp (Wu et al., 1993; Akagi et al., 1996; Panaud et al., 1996; Chen et al., 1997; Temnykh et al., 2000; Brondani et al., 2001; Temnykh et al., 2001), sendo que o

mapa atual de *SSR* tem um marcador a cada quatro centiMorgans (Temnykh et al., 2001). Recentemente, a publicação do seqüenciamento do cultivar Nipponbare (Goff et al., 2002) indicou a presença de um *SSR* a cada 8.000 pares de bases (bp) para um total seqüenciado de 48.351 pb.

Marcadores do tipo AFLP possuem grande capacidade para detecção de variabilidade genética ao nível de DNA (Vos et al., 1995) e têm sido utilizados com sucesso para a caracterização de cultivares e saturação de mapas em espécies cultivadas (Mohan et al., 1997). Essa técnica é eficiente para o mapeamento de populações e identificação dos marcadores associados a características de interesse. Contudo, seu uso não é indicado para seleção assistida, devido ao custo elevado e treinamento especializado, tornando-a seu uso inviável na rotina de um programa de melhoramento. No entanto, esses obstáculos podem ser superados através da conversão dos marcadores identificados em marcadores mais práticos e de menor custo (Barbosa, 2002).

## **2.7. Mapeamento molecular**

### **2.7.1. Base teórica do mapeamento**

O mapeamento molecular é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies e no melhoramento de plantas. No contexto de melhoramento de plantas, mapas genéticos possibilitam a cobertura e análise completa de genomas; a decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes Mendelianos; a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância econômica; a quantificação do efeito dessas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para uso em programas de melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

No mapeamento molecular é necessário utilizar plantas com reprodução sexuada que sejam capazes de produzir descendência e de marcadores moleculares com comportamento Mendeliano. Ainda, é necessário um grande número de marcadores moleculares altamente polimórficos, que não sofram a influência do ambiente, possibilitando a construção de mapas de ligação para muitas espécies (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Nesses estudos é imprescindível a escolha adequada das linhagens genitoras e o desenvolvimento de populações segregantes, a identificação de genótipos através das técnicas de biologia molecular e a utilização de diferentes técnicas de análise estatística e computacional para estimar a ligação e distância entre os marcadores (Milach et al., *in press*).

Mapear é localizar seqüências de DNA e genes que codificam características importantes no genoma de uma espécie de interesse. E essa localização é dada pela distância entre segmentos de DNA e entre locos que codificam características importantes em termos da porcentagem de recombinação ou centiMorgans (medida de distância genética obtida a partir da porcentagem de recombinação através de uma função matemática) (Milach et al., *in press*).

Características de importância agrônômica podem ser qualitativas ou quantitativas e o princípio básico do mapeamento molecular é o mesmo, diferindo apenas pela necessidade de construção de um mapa molecular, no caso de características quantitativas, e pelas análises e programas estatísticos necessários em cada caso (Milach et al., *in press*).

No mapeamento de características qualitativas e quantitativas a seleção de genitores baseia-se na utilização de indivíduos fenotipicamente contrastantes, permitindo, assim, que os locos associados às características a serem mapeadas sejam detectados mais

facilmente. Porém, no caso de características quantitativas, o desenvolvimento da progênie segregante deve resultar em um número razoável de indivíduos para que seja possível obter uma amostra com todas as combinações possíveis, podendo estimar a partir desta amostra a frequência de recombinação genética entre os marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A utilização de marcadores moleculares ligados a características de interesse agrônômico aumenta o entendimento da base genética da herança dessas características e facilita a seleção assistida por marcadores moleculares. Quanto maior o número de marcadores associados a genes de interesse, mais viável será a utilização desses em programas de melhoramento (Milach & Cruz, 1997).

### **2.7.2. Mapas genéticos de ligação em arroz**

O uso de marcadores moleculares na construção de mapas genéticos em arroz tem sido um dos maiores avanços de estudos genéticos na espécie. O primeiro mapa genético utilizando marcadores moleculares foi desenvolvido pela Universidade de Cornell em colaboração com o IRRI (*International Rice Research Institute*), utilizando 135 marcadores RFLP (McCouch et al., 1988). Esse mapa foi construído em uma população F<sub>2</sub>, proveniente de um cruzamento Índica x Japônica tropical.

O segundo mapa de RFLP contendo 322 marcadores, derivado de um cruzamento Índica x Japônica, foi construído por Saito et al. (1991). Em 1994, um número ainda maior de marcadores RFLP (726) contribuiu para o desenvolvimento de um mapa na população *O. sativa* (espécie cultivada) x *O. longistaminata* (espécie silvestre) (Causse et al., 1994).

Um mapa ainda mais saturado foi construído utilizando cerca de 2275 marcadores na população F<sub>2</sub>, derivada de um cruzamento Nipponbare (Japônica) x Kasalath (Índica) (Harushima et al., 1998). Mais recentemente foi desenvolvido um mapa de ligação entre as espécies *O. sativa* e *O. glaberrima* baseado em marcadores de *SSR*

(Lourieux et al., 2000). Chen et al. (1997) construíram um mapa com noventa e quatro novos marcadores SSR com uma média de um SSR a cada 16-20 cM, distribuídos ao longo dos 12 cromossomos do arroz.

À medida que mais mapas forem sendo construídos é possível a identificação de locos qualitativos e quantitativos no genoma da espécie, através de sua associação com marcadores moleculares, permitindo dissecar geneticamente características agronômicas de interesse, além de ser o primeiro passo no desenvolvimento dos procedimentos utilizados na seleção assistida por marcadores moleculares. Por esse motivo, vários trabalhos têm sido publicados a respeito do mapeamento de características agronômicas de interesse em arroz.

### **2.7.3. Mapeamento para tolerância ao frio em arroz**

A maioria das características herdáveis de importância agronômica resultam de uma ação conjunta de vários genes. Essas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa. Para a maioria das características quantitativas, poucas informações existem sobre o número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações dos locos que controlam a sua expressão. Esses locos são denominados QTL (*Quantitative trait loci*), ou seja, locos de características quantitativas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Mapas genéticos baseados em marcadores moleculares oferecem a possibilidade de estudar a arquitetura de características quantitativas, ou seja, identificar, mapear e medir a magnitude do efeito dos principais fatores genéticos envolvidos no controle dessas características.

Nos últimos dez anos, muitos QTLs têm sido identificados em arroz. Os QTLs podem incluir dois grupos de genes, o primeiro grupo compreende os genes de maior efeito, ou seja, que controlam características altamente herdáveis. Exemplos de QTLs para

genes de grande efeito que já foram identificados em arroz são os QTLs para altura da planta, resistência à murcha bacteriana, tolerância à submersão, alongação do entrenó, dentre outros. Um outro grupo de genes são os de pequeno efeito no fenótipo, os quais representam 90% dos QTLs encontrados até hoje. Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de identificar QTLs associados a características de interesse em arroz, tais como a resistência a estresses abióticos e bióticos, características morfológicas, características de panícula e de grãos, vigor da plântula, esterilidade de espiguetas, rendimento de grãos, dentre outras (Li, 2001).

Saito et al. (1995) identificaram segmentos nos cromossomos 3 e 4 que controlam tolerância ao frio no estágio de microsporogênese no cultivar Norin-PL8, os quais foram introgrididos de um cultivar Japônica tropical da Indonésia, denominado Silewah. Li et al. (1997) identificaram dois QTLs nos cromossomos 1 e 12 que foram associados com a esterilidade induzida por baixa temperatura no estado heterozigoto em híbridos Índica-Japônica. Takeuchi et al. (2001) identificaram QTLs para tolerância ao frio no período reprodutivo nos cromossomos 1, 7 e 11 em uma população duplo-haplóide proveniente de um cruzamento entre dois cultivares Japônicas temperados.

Recentemente, Andaya & Mackill (2003) identificaram oito QTLs para a tolerância ao frio no estágio de microsporogênese utilizando linhagens recombinantes derivadas de um cruzamento Índica x Japônica. A contribuição fenotípica dos QTLs encontrados variou de 11 a 17% , indicando que a tolerância ao frio no estágio reprodutivo provavelmente é controlado por vários genes de pequeno efeito.

Resultados semelhantes foram obtidos por Suh et al. (1999) ao mapear a tolerância ao frio no período de germinação do arroz. Esses autores relataram a detecção de três QTLs associados à germinação sob temperatura baixa (15°C), sendo que a variação fenotípica explicada pelos QTLs variou de 11,4 a 18,6%.

Com base nos estudos da base genética da tolerância ao frio no período reprodutivo vários genes estão envolvidos, sendo o caráter de natureza poligênica. Os trabalhos citados acima confirmam esses resultados, e por ser a tolerância ao frio uma característica complexa e de difícil seleção a campo, um esforço significativo deve ser feito no sentido de utilizar marcadores moleculares para a identificação de regiões próximas aos genes que controlam a tolerância ao frio nos diferentes períodos de desenvolvimento do arroz.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O mapeamento da tolerância ao frio foi feito utilizando-se 93 indivíduos da população segregante na geração  $F_2$  proveniente do cruzamento entre o cultivar de arroz IRGA 417 (sensível ao frio) e o genótipo Quilla 66304 (tolerante ao frio). O primeiro é um cultivar brasileiro de arroz desenvolvido pelo Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), lançado em 1995 e pertencente à subespécie Índica, e o segundo é um genótipo chileno desenvolvido pelo INIA – Quilamapu, pertencente à subespécie Japônica.

A população  $F_2$ , por ser proveniente de um cruzamento Índica x Japônica, apresentou segregação para outras características fenotípicas, além da tolerância ao frio, as quais foram, então, também incluídas no mapeamento. São elas: estatura de planta, grau de exerceção de panículas, comprimento e largura dos grãos com casca e relação comprimento/largura dos grãos com casca. Outra característica mapeada foi a esterilidade de espiguetas da geração  $F_2$ , a qual tem causas genéticas e é decorrente do cruzamento Índica x Japônica utilizado. A seguir são apresentadas as características fenotípicas.

#### **3.1. Caracterização fenotípica dos genitores e da população $F_2$ quanto à tolerância a baixas temperaturas**

A população  $F_2$  e os dois genitores foram caracterizados quanto à tolerância ao frio nos períodos de germinação e vegetativo por meio do recrescimento do coleótilo e crescimento de plântulas, respectivamente.



### 3.1.1. Recrescimento do coleóptilo

Os dados do recrescimento do coleóptilo para os dois genitores e para a população  $F_2$  proveniente deste cruzamento foram obtidos por Cruz (2001) e a metodologia utilizada será descrita a seguir.

As sementes dos dois genitores e das plantas  $F_2$  de arroz 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. A seguir foram mantidas em água estéril por mais 20 horas em temperatura de 28°C para que dessem início ao processo de absorção de água. Depois desse período, as sementes foram dispostas em papel germinador plissado umedecido com água destilada estéril. Em cada dobra de papel foram dispostas dez sementes, tomando-se o cuidado de colocá-las com o lado onde se encontra o embrião voltado para cima. O papel germinador plissado foi mantido dentro de uma bandeja coberta com filme plástico na câmara de germinação. A temperatura inicial utilizada foi a de 28°C por três dias para que o processo de germinação tivesse início. A seguir a temperatura da câmara foi alterada para 13°C, permanecendo por mais quatro dias. Após esse período de frio, as sementes foram avaliadas quanto ao comprimento do coleóptilo e em seguida voltaram à câmara de germinação com temperatura de 28°C por mais três dias. Ao término desse período, o comprimento do coleóptilo das sementes foi medido novamente. Os dados finais consistiram na diferença entre a segunda medição e a primeira, ou seja, no recrescimento do coleóptilo sob temperatura normal, após um período de frio. No total foram avaliadas 120 sementes  $F_2$  e 30 sementes de cada genitor (três repetições de dez sementes).

### 3.1.2. Crescimento de plântulas

As sementes dos genitores e da população  $F_2$ , previamente avaliadas quanto ao recrescimento do coleóptilo, foram transplantadas para bandejas plásticas (9 x 52,5 x 32,5 cm) contendo solo coletado no campo e adubado com 1,5 g de NPK (2-20-20). As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura em torno de 28°C até duas semanas após o transplante. Quando as plântulas apresentavam de duas a três folhas, elas foram levadas para uma sala climatizada com temperatura de 15°C, radiação de  $1517,7 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  e fotoperíodo de 12h. As plântulas permaneceram sob o tratamento de frio por 12 dias e após este período foram levadas de volta à casa-de-vegetação. A tolerância ao frio no período vegetativo foi avaliada por meio do crescimento de plântulas durante o tratamento de frio, obtido pela medição da estatura individual das plântulas  $F_2$  e dos genitores em cm, antes e logo após o período de frio, e calculando-se a diferença entre a segunda e a primeira medição conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Crescimento sob frio} = \text{Estatura após tratamento frio} - \text{Estatura antes tratamento frio}$$

### 3.2. Caracterização fenotípica dos genitores e da população $F_2$ quanto às características de planta e dos grãos

Após a avaliação das plântulas  $F_2$  quanto à tolerância ao frio, as mesmas foram transplantadas para baldes e mantidas em casa-de-vegetação a 28°C até a maturação e colheita de sementes da geração  $F_3$ . Os baldes continham solo coletado no campo adubado com 3 g da fórmula 2-20-20 (NPK) e a adubação nitrogenada em cobertura foi feita com 2g de uréia (45% N) aplicada dez dias após o transplante das plântulas.

Por ocasião da maturação, as plantas da geração  $F_2$  foram avaliadas quanto à estatura e tiveram todas as panículas colhidas para posterior determinação do grau de exerceção da panícula, porcentagem de esterilidade de espiguetas, comprimento, largura e razão comprimento/largura dos grãos com casca.

No presente trabalho optou-se por estudar essas características nas plantas  $F_2$  provenientes de um cruzamento Índica e Japônica, por serem características que diferenciam as duas subespécies e porque são estudadas também sob condições de frio. A baixa estatura das plantas pode ocorrer durante o estágio de plântula, já a má exerceção da panícula, além de ser uma característica que diferencia as subespécies, é um dano causado pelo frio no estágio reprodutivo da cultura (Souza, 1990). A esterilidade das espiguetas é um problema que pode ser ocasionado durante o estágio de antese, pois as baixas temperaturas do ar dificultam a abertura das anteras ou o crescimento do tubo polínico (Ferraz, 1987). Além disso, a esterilidade das espiguetas ocorre quando duas espécies muito distintas são cruzadas, neste caso Índica x Japônica.

### **3.2.1. Estatura de planta**

A estatura dos genitores e da população  $F_2$  foi medida considerando a distância da base da planta até o ápice da panícula do colmo principal, em cm.

### **3.2.2. Grau de exerceção da panícula**

O grau de exerceção da panícula foi estimada considerando à distância, em cm, entre a base da panícula e a lígula da folha bandeira. Valores positivos indicaram exerceção completa, ou seja, que a base da panícula se encontrava acima da lígula da folha bandeira, e valores negativos exerceção incompleta da panícula, ou que a base da panícula estava dentro da bainha da folha bandeira.

### **3.2.3. Porcentagem de esterilidade de espiguetas**

A porcentagem de esterilidade de espiguetas da população  $F_2$  foi determinada com base em todas as panículas de cada planta por meio da contagem, em cada uma delas, do número de espiguetas cheias (férteis) e vazias (não férteis), em cada uma das panículas.

Assim, a porcentagem média de esterilidade de espiguetas das plantas F<sub>2</sub> foi obtida pela fórmula:

$$E = \frac{\sum \left( \frac{V}{T} \cdot 100 \right)}{N}$$

Onde:

E = esterilidade média, expressa em porcentagem

V = número de espiguetas vazias

T = número total de espiguetas

N = número total de panículas avaliadas

#### **3.2.4. Características físicas dos grãos**

As características físicas dos grãos da população F<sub>2</sub> foram determinadas com base nas sementes F<sub>3</sub> provenientes da panícula principal de cada planta F<sub>2</sub>. As sementes com casca foram avaliadas quanto ao comprimento (mm) e largura (mm) com o auxílio de um paquímetro digital, marca *Starret*, e a razão comprimento/largura foi também obtida. As três características físicas dos grãos da geração F<sub>2</sub> corresponderam, então, à média das sementes F<sub>3</sub> avaliadas.

#### **3.3. Análise estatística**

As características fenotípicas foram submetidas à análise de resíduos e regressão no programa SAS (*Statistical Analysis System*) com o objetivo de verificar a normalidade dos dados e necessidade de transformação, respectivamente, uma vez que para a identificação de QTLs é necessário que os dados apresentem uma distribuição normal.

Os resultados dessas análises indicaram ser necessário transformar a característica esterilidade de espiguetas segundo a raiz quadrada de X + 100 e o crescimento de plântulas segundo a raiz quadrada de X. A exerceção da panícula e o

comprimento de grãos com casca apresentaram uma distribuição normal, não sendo necessário a transformação dos dados. As demais características apresentaram distribuição normal após a retirada de alguns valores extremos (*outliers*).

As distribuições de freqüências para as gerações P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e F<sub>2</sub> foram obtidas pelo agrupamento dos dados em classes, sendo o intervalo de classe tomado como ¼ do desvio padrão médio (Steel & Torrie, 1980).

As variâncias foram estimadas de acordo com Allard (1960):

$$\begin{aligned} VP &= VF_2 \\ VE &= \frac{(VP_1 + VP_2)}{2} \\ VG &= VP - VE \end{aligned}$$

Onde:

VE = variância ambiental

VG = variância genética

VP = variância fenotípica

VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub> e VF<sub>2</sub> representam as variâncias das gerações P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e F<sub>2</sub>, respectivamente.

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo foram calculadas conforme Allard (1960):

$$h_a^2 = \frac{VP - VE}{VP}$$

A herança das características foi estudada através das distribuições de freqüência na população F<sub>2</sub> e do teste do Qui-quadrado.

O valor do teste de Qui-quadrado foi obtido pela fórmula:

$$\chi^2 = \frac{\sum (F_o - F_e)^2}{F_e}$$

Onde:

$F_o$  = frequência observada para cada classe;

$F_e$  = frequência esperada para cada classe, com base na proporção mendeliana.

### **3.4. Construção do mapa molecular**

A construção do mapa genético da população  $F_2$  do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304 foi feita utilizando marcadores moleculares dos tipos SSR (Litt & Luty, 1989) e AFLP (Vos et al., 1995).

#### **3.4.1. Extração e quantificação do DNA**

A extração de DNA dos genitores e da população  $F_2$  foi realizada a partir de uma folha jovem coletada em cada plântula antes do início do tratamento de frio no período vegetativo. Após a coleta, o tecido fresco foi imediatamente armazenado em tubos Falcon e colocado em nitrogênio líquido, a  $-180^\circ\text{C}$ .

O protocolo utilizado para a extração do DNA foi o proposto por Murray & Thompson (1980), com algumas modificações, as quais estão descritas abaixo.

Para a extração de DNA foi utilizado o seguinte tampão de extração: Tris-HCL 110 mM pH 8,0, EDTA 55 mM, NaCl 1,4 M e CTAB (Bromato de hexadecylmethylamonia) 1,1%.

O tampão de extração previamente aquecido a  $65^\circ\text{C}$  foi adicionado em cada tubo contendo o tecido vegetal, na quantidade de 620  $\mu\text{L}$ . Imediatamente adicionou-se 1,56  $\mu\text{L}$  de Proteinase K em solução Tris EDTA (TE) 20 mg/mL resfriado na concentração 1X e 69  $\mu\text{L}$  de SDS 20%, invertendo-se gentilmente as amostras. Após, elas foram incubadas por uma hora à  $65^\circ\text{C}$  e a seguir removidas do banho-maria e deixadas esfriar por cinco minutos na bancada. Na capela de exaustão foram adicionados 625  $\mu\text{L}$  de fenol/clorofórmio (1:1), misturando-se por cinco minutos até formar uma emulsão. A seguir as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por cinco minutos, e o sobrenadante foi removido para um tubo

novo, no qual foi adicionado 2/3 do volume da amostra de isopropanol, centrifugando-se novamente a 13000 rpm por cinco minutos e desprezando-se o sobrenadante. O pellet foi lavado com etanol 70% e o DNA foi seco em câmara de fluxo previamente limpa por cinco horas, sendo a seguir diluído em 50 µL de TE 0,1X com RNase A. A seguir o DNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol 95%, e por fim, ressuspendido em 20 µL de TE 0,1X.

A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro (Spectronic® Genesys™), e a concentração de DNA calculada pela fórmula:

$$\frac{A_{260} \cdot 100 \cdot 50}{1000} = \mu\text{g de DNA}/\mu\text{L de solução}$$

Onde:

A = Absorbância a 260 nm

50 = fator de conversão para solução de 50µg/mL para dupla fita de DNA

100 = fator de diluição

A qualidade do DNA foi dada pela relação  $A_{260}/A_{280}$  nm, onde  $A_{280}$  representa a absorbância no comprimento de 280 nm e corresponde a quantidade de proteína contida na amostra. Somente as amostras com relação igual ou superior a 1,8 foram utilizadas no estudo.

Noventa e três indivíduos da população  $F_2$  e os respectivos genitores foram analisados com as técnicas de SSR e AFLP, descritas a seguir.

### 3.4.2. Marcadores SSR

Neste trabalho foram utilizados 50 pares de *primers* selecionados do estudo realizado por Chen et al. (1997), os quais correspondem a 53 locos de SSR (Tabela 1). Os pares de *primers* foram escolhidos com base na localização cromossômica dos locos que

amplificam, tendo-se utilizado aproximadamente dois locos por braço cromossômico, de forma a abranger uniformemente todo o genoma do arroz.

Tabela 1. Locos de SSR utilizados na análise da população F<sub>2</sub> proveniente do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304, seqüência dos pares de *primers*, localização crossômica (CRM), tamanho dos alelos (TAM) no cultivar IR36 e temperatura de anelamento (TA). UFRGS, 2003.

Locos <sup>1</sup>	Seqüência dos <i>primers</i> <sup>2</sup>	CRM	TAM(pb)	TA(°C)
RM81**	F5'GAGTGCTTGTGCAAGATCCA3' R5'CTTCTTCACTCATGCAGTTC3'	1 e 3	110	58
RM212*	F5'CCACTTTCAGCTACTACCAG3' R5'CACCCATTTGTCTCTCATTATG3'	1	136	60
RM220	F5'GGAAGGTAAGTGTTCACCAAC3' R5'GAAATGCTTCCCACATGTCT3'	1	127	57
RM238	F5'GATGGAAAAGCACGTGCACTA3' R5'ACAGGCAATCCGTAGACTCG3'	1 e 6	147	60
RM246	F5'GAGCTCCATCAGCCATTCAG3' R5'CTGAGTGCTGCTGCGACT3'	1	116	58
RM259*	F5'TGGAGTTTGAGAGGAGGG3' R5'CTTGTTGCATGGTGCCATGT3'	1	162	57
RM207	F5'CCATTTCGTGAGAAGATCTGA3' R5'CACCTCATCCTCGTAACGCC3'	2	118	60
RM208	F5'TCTGCAAGCCTTGTCTGATG3' R5'TAAGTCGAATCATTGTGTGGACC3'	2	173	60
RM233**	F5'CCAAATGAACCTACATGTTG R5'GCATTGCAGACAGCTATTGA3'	2 e 5	162	57
RM240*	F5'CCTTAATGGGTAGTGTGCAC3' R5'TGTAACCATTCCTTCCATCC3'	2	132	58
RM263	F5'CCCAGGCTAGCTCATGAACC3' R5'GCTACGTTTGAGCTACCACG3'	2	199	63
RM55	F5'CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG3' R5'TCCCGCTTATTTAAGGCG3'	3	226	60
RM227	F5'ACTTTCGTCATAAAGACGAG3' R5'GATTGGAGAGAAAAGAAGCC3'	3	106	58
RM231*	F5'CCAGATTATTCCTGAGGTC3' R5'CACTTGCATAGTTCTGCATTG3'	3	182	58
RM232	F5'CCGGTATCCTTCGATATGCG3' R5'CCGACTTTTCCTCCTGACG3'	3	158	60
RM241	F5'GAGCCAAATAAGATCGCTGA3' R5'TGCAAGACGCAGATTTAGTG3'	4	138	57
RM252*	F5'TTCGCTGACGTGATAGGTTG3' R5'ATGACTTGATCCCAGACAACG3'	4	216	60
RM255	F5'TGTTGCGTGTGGAGATGTG3' R5'CGAAACCGCTCAGTTCAAC3'	4	144	57
RM261	F5'CTACTTCTCCCCTTGTGTCG3' R5'TGTACCATCGCCAAATCTCC3'	4	125	58
RM26*	F5'GAGTCGACGAGCGGACAGA3' R5'CTGTGAGCGACGGTAACA3'	5	112	58
RM249	F5'GGCGTAAAGGTTTTGCATGT3' R5'ATGATGCCATGAAGGTCAGC3'	5	121	58
RM30	F5'GGTTAGGCATCGTCACGG3' R5'TCACCTCACACACGACACG3'	6	105	60
RM225*	F5'TGCCCATATGGTCTGGATG3' R5'GAAAGTGGATCAGGAAGGC3'	6	140	57



Tabela 1. Locos de SSR utilizados... (continuação)

Locos <sup>1</sup>	Seqüência dos primers <sup>2</sup>	CRM	TAM(pb)	TA(°C)
RM253*	F5'TCCTTCAAGAGTGCAAACCC3' R5'GCATTGTCATGTCGAAGCC3'	6	141	57
RM70	F5'GTGGACTTCATTCAACTCG3' R5'GATGTATAAGATAGTCCC3'	7	170	54
RM82	F5'TGCTTCTTGTCAATTCGCC3' R5'CGACTCGTGGAGGTACGG3'	7	186	57
RM214*	F5'CTGATGATACAAACCTCTTCTC3' R5'AAGAACAGCTGACTTCACAA3'	7	112	59
RM234*	F5'ACAGTATCCAAGGCCCTGG3' R5'CACGTGAGACAAAGACGGAG3'	7	156	60
RM248	F5'TCCTTGTGAAATCTGGTCCC3' R5'GTAGCCTAGCATGGTGCATG3'	7	102	60
RM25*	F5'GGAAAGAATGATCTTTTCATGG3' R5'CTACCATCAAAACCAATGTTTC3'	8	146	59
RM38	F5'ACGAGCTCTCGATCAGCCTA3' R5'TCGGTCTCCATGTCCCAC3'	8	250	60
RM210	F5'TCACATTTCGGTGGCATTG3' R5'CGAGGATGGTTGTTCACTTG3'	8	140	57
RM223	F5'GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC3' R5'GAGGCAAGTCTTGGCACTG3'	8	165	60
RM230	F5'GCCAGACCGTGGATGTTC3' R5'CACCGCAGTCACTTTTCAAG3'	8	257	59
RM201*	F5'CTCGTTTATTACCTACAGTACC3' R5'CTACCTCCTTTCTAGACCGATA3'	9	158	57
RM219*	F5'CGTCGGATGATGTAAAGCCT3' R5'CATATCGGCATTCGCCTG3'	9	202	58
RM242*	F5'GGCCAACGTGTGTATGTCTC3' R5'TATATGCCAAGACGGATGGG3'	9	225	60
RM245*	F5'ATGCCGCCAGTGAATAGC3' R5'CTGAGAATCCAATTATCTGGGG3'	9	150	60
RM257*	F5'CAGTTCCGAGCAAGAGTACTC3' R5'GGATCGGACGTGGCATATG3'	9	147	62
RM222	F5'CTTAAATGGGCCACATGCG3' R5'CAAAGCTTCCGGCCAAAAG3'	10	213	58
RM228	F5'CTGGCCATTAGTCCTTG3' R5'GCTTGCGGCTCTGCTTAC3'	10	154	57
RM239	F5'TACAAAATGCTGGGTACCCC3' R5'ACATATGGGACCCACCTGTC3'	10	144	61
RM258	F5'TGCTGTATGTAGCTCGCACC3' R5'TGGCCTTTAAAGCTGTCCG3'	10	148	62
RM202*	F5'CAGATTGGAGATGAAGTCTCC3' R5'CCAGCAAGCATGTCAATGTA3'	11	189	62
RM206	F5'CCCATGCGTTTAACTATTCT3' R5'CGTTCCATCGATCCGTATGG3'	11	147	59
RM209*	F5'ATATGAGTTGCTGTCTGCG3' R5'CAACTTGCATCCTCCCCTCC3'	11	134	62
RM224*	F5'ATCGATCGATGTTACGAGG3' R5'TGCTATAAAAAGGCATTCCGG3'	11	157	59
RM83	F5'ACTCGATGACAAGTTGAGG3' R5'CACCTAGACACGATCGAG3'	12	142	56
RM235*	F5'AGAAGCTAGGGCTAACGAAC3' R5'TCACCTGGTCAGCCTTTTC3'	12	124	61
RM247*	F5'TAGTGCCGATCGATGTAACG3' R5'CATATGGTTTTGACAAAAGCA3'	12	131	58

<sup>1</sup> Nomenclatura de acordo com Chen et al. (1997)<sup>2</sup> F = *forward* (esquerda); R = *reverse* (direita)

\* Locos polimórficos na população IRGA 417 x Quilla 66304

Os marcadores SSR se baseiam na reação de PCR e foram identificados através da reação contendo 0,2  $\mu\text{M}$  de cada par de *primer*, 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, KCL 50 mM, TRIS-Cl 10 mM pH 8,3,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, 1U de Taq DNA polimerase (Gibco, BRL) e 13 ng de DNA genômico. O volume final foi de 13 $\mu\text{L}$  completado com água ultrapura estéril.

A amplificação do DNA foi feita em termociclador *MJ Research* utilizando o seguinte programa: 94°C por 5' (desnaturação), seguido por 35 ciclos de 94°C por 1', 55°C por 1', 72°C por 2' e finalmente 72°C por 5' para a extensão final. Foram utilizadas diferentes temperaturas de anelamento, as quais variaram de 54 a 63°C (Tabela 1), e foram calculadas conforme a composição das bases púricas (adenina e guanina) e pirimídicas (citosina e timina) de cada par de *primer*, conforme a fórmula abaixo:

$$T_a = 2 \cdot \sum(AT) + 4 \cdot \sum(CG)$$

Onde:

$T_a$  = temperatura de anelamento (°C);

$\sum(AT)$  = somatório das bases adenina e timina;

$\sum(CG)$  = somatório das bases citosina e guanina.

#### 3.4.2.1. Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 3% contendo tampão Tris-ácido-bórico-EDTA a 0,5X (TBE), submetidos a voltagem de 120V por 2h. Todos os géis foram polimerizados por pelo menos meia hora em temperatura ambiente e meia hora na geladeira, a fim de obter um gel mais consistente e uma melhor separação dos fragmentos de DNA.

A visualização dos padrões de bandas para a identificação dos polimorfismos foi feita através da técnica de coloração com Brometo de Etídio (0,03 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) em um volume

final de gel de 300 mL e os padrões de bandas foram visualizados em transiluminador UV sendo os géis, em seguida, fotografados pelo sistema *Kodak Digital Science*. Foi utilizado DNA ladder 100pb (*Gibco Research Laboratories*, BRL) como marcador de peso molecular em todos os géis.

### **3.4.3. Marcadores de AFLP**

A técnica de AFLP seguiu o protocolo de Vos et al. (1995), com algumas adaptações. As etapas com as modificações estão descritas a seguir.

#### **3.4.3.1. Digestão do DNA genômico**

A digestão do DNA foi feita em duas etapas: digestão com uma enzima de corte freqüente (TRU9) (isoesquisômero da MseI) combinada com uma enzima de corte raro (EcoRI). A enzima de corte raro reconhece uma seqüência de seis pares de bases (5'GAATTC 3', 3'CTTAAG 5') e a enzima de corte freqüente reconhece uma seqüência de quatro pares de bases (5'-TTAA-3', 3'AATT-5'). O DNA genômico (250 ng) foi digerido primeiramente com a enzima de corte freqüente por duas horas a 65°C e posteriormente com a enzima de corte raro, a 37°C.

#### **3.4.3.2. Ligação de adaptadores específicos**

Foram utilizados adaptadores específicos senso e anti-senso (Mse 1.1 e 1.2; Eco 1.1 e 1.2) (*Gibco*, BRL) que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da digestão pelas enzimas de restrição. Para os fragmentos resultantes da digestão com a enzima TRU9 foi utilizado o adaptador da MseI. Esses adaptadores possuem seqüências específicas complementares a diferentes *primers* para amplificação pela técnica de PCR, e foram previamente anelados a fim de se obter a conformação da fita dupla.

Os adaptadores foram adicionados ao DNA digerido e ligados ao mesmo, durante duas horas à temperatura ambiente, com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (Gibco, BRL).

#### **3.4.3.3. Pré-amplificação dos fragmentos de DNA**

Nesta etapa foi feita uma pré-seleção dos fragmentos a serem amplificados utilizando *primers* que reconhecem cada seqüência dos adaptadores acrescidos de um nucleotídeo seletivo. O nucleotídeo seletivo foi A para o *primer* EcoRI e C para o *primer* MseI, sendo denominados E + A e M + C, respectivamente.

Para cada amostra foi utilizado 1µl do DNA previamente submetido à ligação com os adaptadores específicos, ao qual foram adicionados 37,5 ng de E + A *primer*, 37,5 ng de M + C *primer*, dNTP 0,8 mM, tampão da Taq DNA polimerase 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1U de Taq DNA polimerase. Foi utilizado um termociclador (MJ PTC100) programado para 20 ciclos de 94°C por 30'', 56°C por 1' e 72°C por 1'. Após o término do programa, cada amostra foi diluída com água ultrapura estéril, na proporção 1:5 (DNA:H<sub>2</sub>O).

#### **3.4.3.4. Amplificação seletiva dos fragmentos de DNA**

Os fragmentos amplificados na etapa anterior foram selecionados novamente a partir da amplificação com 12 combinações de *primers* MseI/EcoRI, contendo dois nucleotídeos arbitrários adicionais (Tabela 2).

A amplificação seletiva foi realizada em termociclador, utilizando-se o seguinte programa: 9 ciclos de 94°C por 60'', 65°C por 60'' e 72°C por 90'', sendo que a cada ciclo a temperatura de anelamento diminuiu 1°C; e por fim, 23 ciclos de 94°C por 30'', 56°C por 30'' e 72°C por 90''.

Tabela 2. Combinações de primers MseI/EcoRI utilizados para amplificação seletiva seguindo o protocolo de AFLP, para o mapeamento da população IRGA 417 x Quilla 66304. UFRGS, 2003.

<b>Combinações de primers MseI/EcoRI</b>		
CGA/ACT	CCC/ACG	CGA/ACT
CCT/AAC	CGC/AGC	CGC/ACA
CAT/ACC	CCA/AGG	CAT/AAG
CAA/AAG	CTA/AAC	CAA/AGC

O protocolo de reação de PCR foi o seguinte: 30ng de *primer* EcoRI, 30ng de *primer* MseI, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP 0,8mM, tampão da Taq DNA polimerase 1X, 1U de Taq DNA polimerase.

Ao final do processo de amplificação seletiva foram adicionados a cada amostra 20 µL da solução de uréia (8 M) acrescida de 0,025% de xileno cianol, 0,025% de azul de bromofenol e 0,04% de orange G.

#### **3.4.3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (19:1 – acrilamida:bisacrilamida) de alta resolução e contendo TBE 1X, para a separação dos fragmentos amplificados. Os géis foram preparados utilizando os seguintes componentes: 42 g de uréia + 10 mL de solução tampão TBE + 12,5 mL de bis-acrilamida a 40% (19:1) + ddH<sub>2</sub>O até completar 100 mL + 200 µL Temed + 200 µl de solução de persulfato de amônia a 20%. Todos os géis foram polimerizados por, pelo menos, 2h e pré-aquecidos durante 45 minutos a 85 watts, antes da eletroforese.

Foram aplicados 3,5 µL de cada amostra no gel, as quais foram previamente desnaturadas a 94°C por 10'. Além dos 93 indivíduos da população F<sub>2</sub>, foram aplicadas duas amostras dos dois genitores e duas amostras do marcador DNA ladder 100pb (Gibco, BRL) a fim de permitir a posterior determinação do tamanho dos fragmentos separados no gel.

Os géis foram submetidos a uma voltagem de 2000Volts e 85Watts de potência durante 2h e 30min, aproximadamente.

A coloração dos géis para identificação das bandas polimórficas foi feita com nitrato de prata, seguindo o protocolo sugerido por *Promega Corporation* (1996).

#### **3.4.4. Análise dos dados moleculares**

##### **3.4.4.1. Marcadores SSR**

Os dados dos marcadores SSR, obtidos por interpretação visual das imagens captadas pelo programa *Kodak Digital Science*, foram codificados conforme descrito a seguir. O código A foi conferido quando o indivíduo segregante era igual ao genitor Quilla 66304, ou seja, apresentou o mesmo alelo do genitor 1; o código B, quando o indivíduo era igual ao genitor IRGA 417 e o código H quando o indivíduo era heterozigoto, ou seja, apresentou um alelo de cada genitor. O genitor 1 correspondeu ao genótipo Quilla 66304 por ser esse o genótipo que confere tolerância ao frio, e o genitor 2 correspondeu ao genótipo IRGA 417, o qual é sensível a baixas temperaturas. Os dados codificados foram, então, utilizados na análise para mapeamento.

##### **3.4.4.2. Marcadores AFLP**

Para os marcadores AFLP os dados foram obtidos por interpretação visual dos géis e analisados por duas pessoas, a fim de reduzir ao máximo a possibilidade de erros de avaliação.

Para a nomenclatura dos marcadores, utilizou-se a letra M, indicando o *primer* Mse1, seguido dos dois últimos nucleotídeos do *primer*, e a letra E para o *primer* EcoRI, seguido dos dois últimos nucleotídeos do mesmo. O número apresentado no final do nome de cada marcador indica o tamanho aproximado do fragmento obtido.

Os dados foram analisados como presença (1) ou ausência (0) de bandas e foram transformados por códigos A, B, C e D, adequados ao programa. O código A foi conferido aos indivíduos segregantes semelhantes ao genitor 1 ( $P_1$ ), quando o mesmo apresentou ausência de banda ( $A=P_1=0$ ). Os demais códigos foram estabelecidos da seguinte forma:  $B=P_2=0$ ,  $D=P_1=1$  e  $C=P_2=1$ .

#### **3.4.5. Construção do mapa genético**

Para a identificação dos grupos de ligação com base nos marcadores de SSR e AFLP foram testados vários níveis de LOD *score* no programa Mapmaker/Exp 3.0 (Lander et al., 1987), sendo que o mapa final foi obtido com  $LOD = 6$  e nível máximo de recombinação 30. As distâncias em centiMorgans (cM) foram calculadas usando a função Kosambi de mapeamento (Kosambi, 1944).

#### **3.4.6. Detecção de QTLs para as características fenotípicas**

Após a construção do mapa, os marcadores efetivamente integrados ao mapa foram submetidos à análise de mapeamento de intervalo simples para identificar quais deles estão associados à característica de tolerância ao frio e/ou às outras características avaliadas, através do programa Mapmaker/QTL (Lander et al., 1987).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Distribuições de frequência das características fenotípicas**

Foram obtidas as distribuições de frequências dos genitores e da população  $F_2$  para as características de tolerância ao frio e demais características analisadas (Figura 1).

O recrescimento do coleóptilo foi avaliado por Cruz (2001) que constatou um comportamento contínuo da  $F_2$  e uma elevada segregação transgressiva em relação aos genitores. Houve uma sobreposição dos dois genótipos genitores, porém, a média do recrescimento do coleóptilo para o genitor tolerante foi em torno de 14,3 mm e a média para o genitor sensível de 8,8 mm, as quais não diferiram entre si (Tabela 3). A distribuição contínua na geração  $F_2$  mostrou uma tendência em relação ao maior recrescimento do coleóptilo e a média da população foi de 18,7 mm, superior à do genitor tolerante (Figura 1). Esses resultados sugerem a presença de genes com efeito menor atuando sobre o caráter, bem como a distribuição complementar de genes entre os genitores.



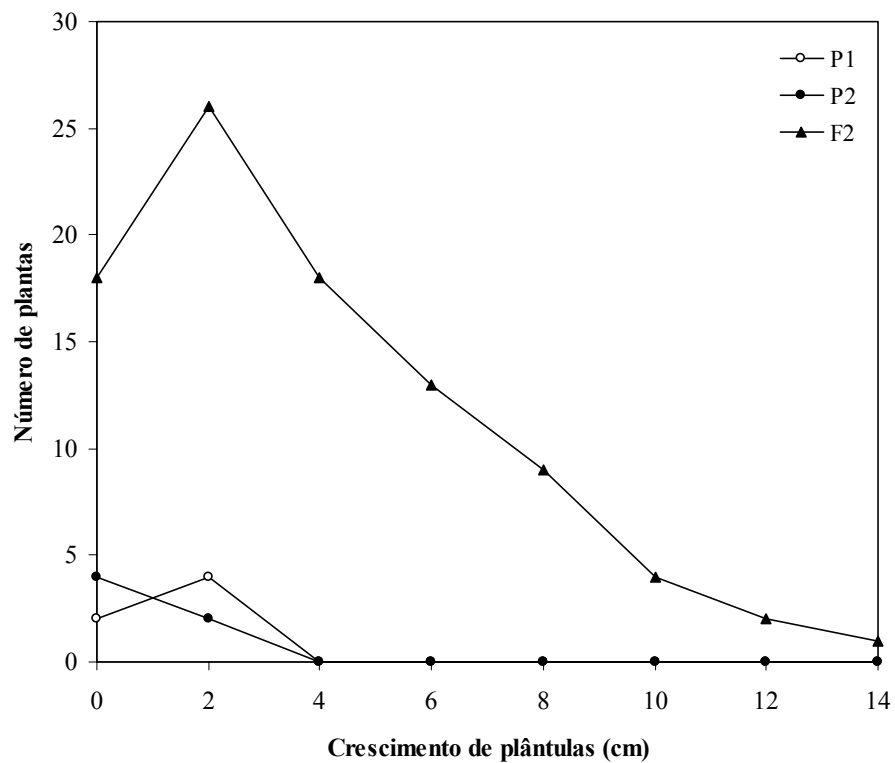
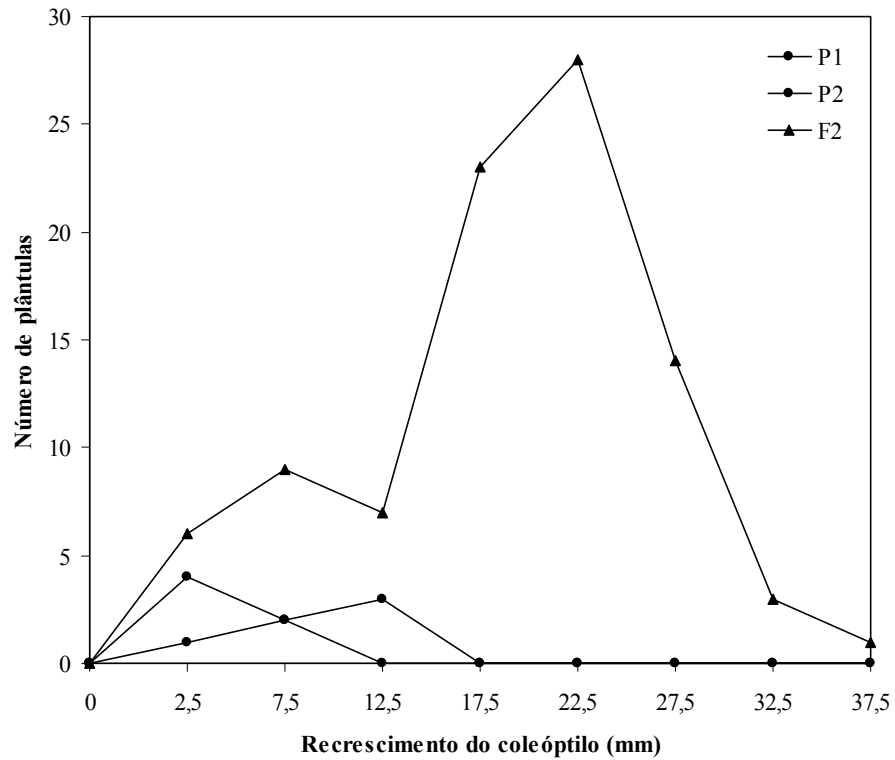


Figura 1. Distribuições de frequência para recrescimento do coleóptilo (mm), crescimento de plântulas (cm), estatura de plantas (cm), grau de exerceção da panícula (cm), esterilidade de espiguetas (%), comprimento do grão (mm), largura do grão (mm), relação comprimento/largura para o genótipo Quilla 66304 (P1), IRGA 417 (P2) e população F<sub>2</sub> (F2), UFRGS, 2003.

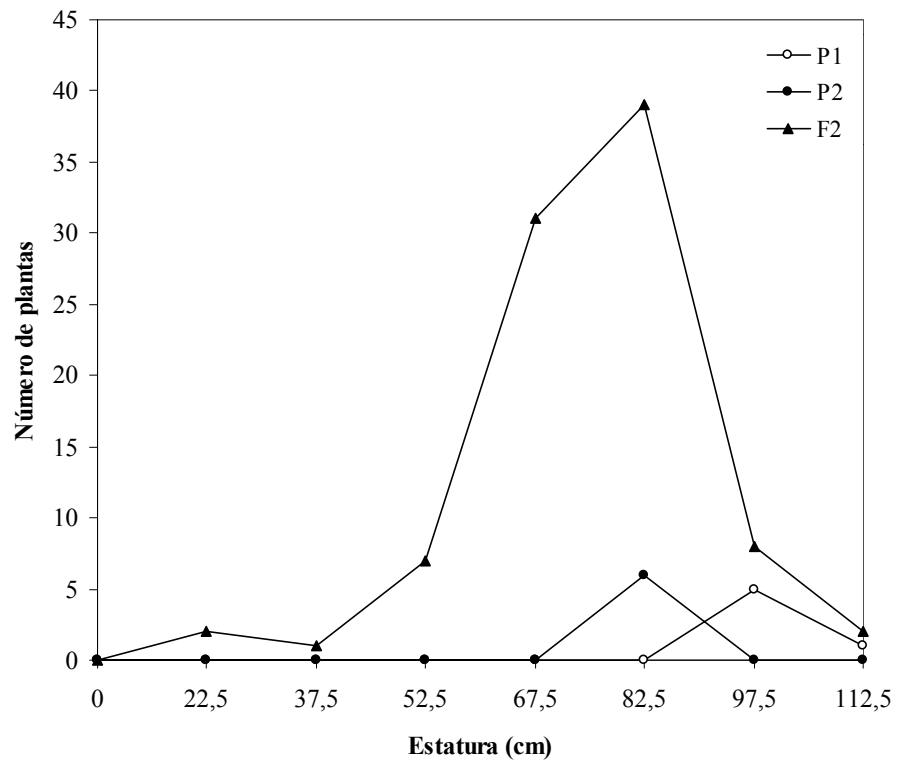
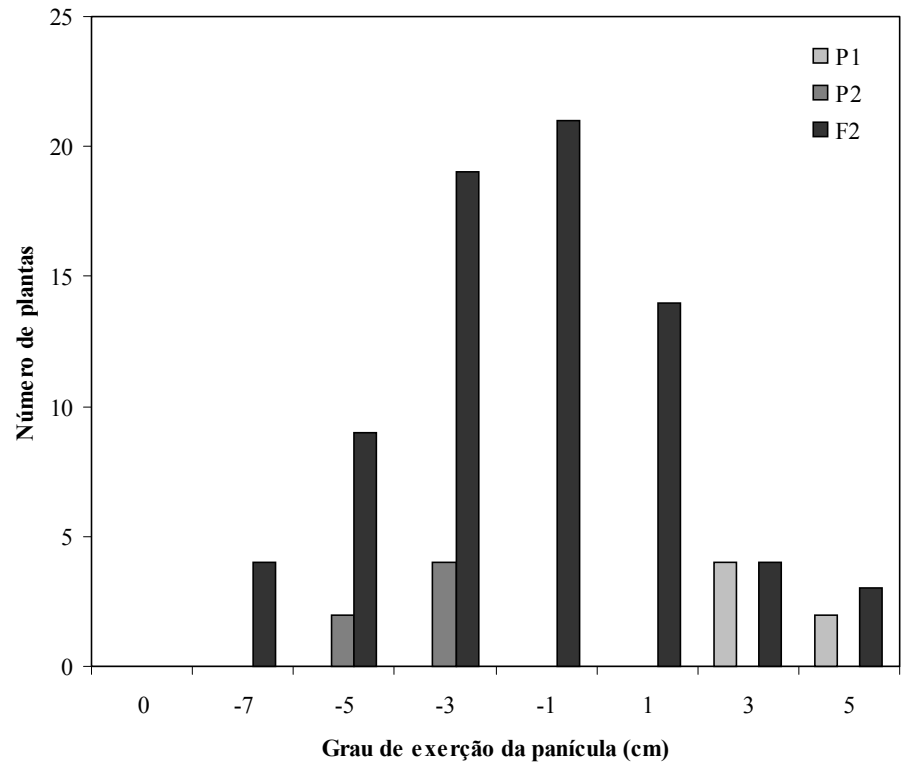


Figura 1. Distribuições de frequência... (continuação)

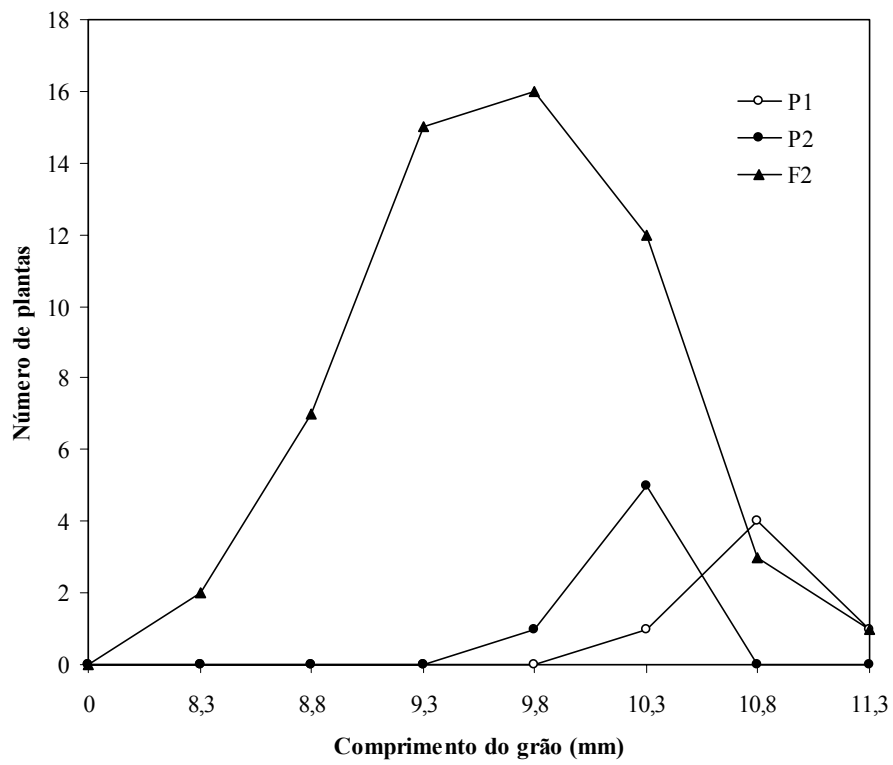
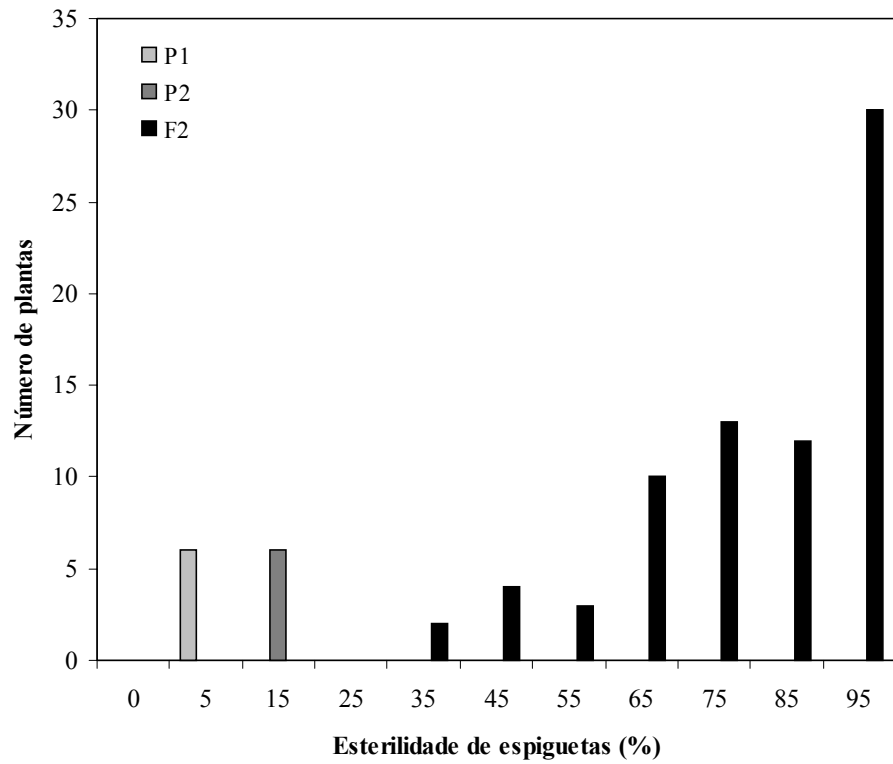


Figura 1. Distribuições de frequência... (continuação)

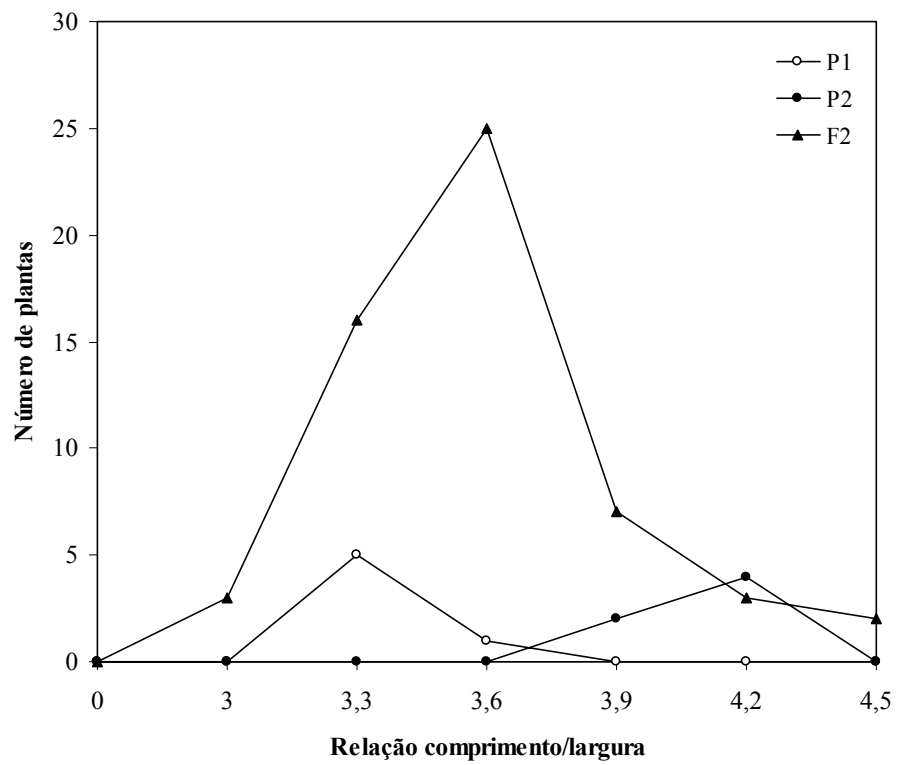
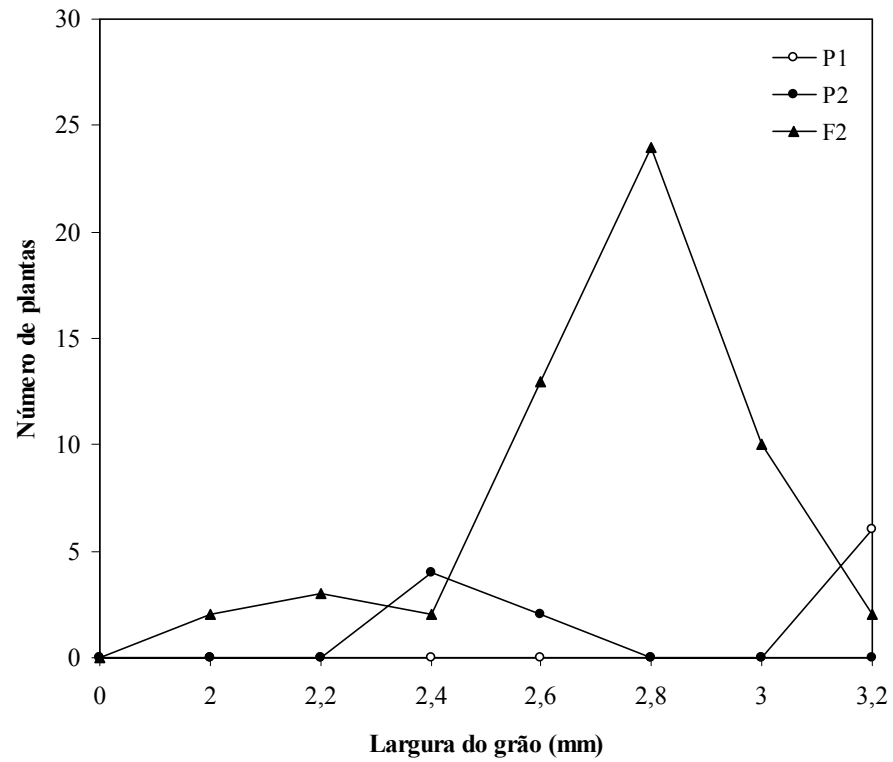


Figura 1. Distribuições de frequência... (continuação)

Resultados semelhantes foram obtidos por Suh et al. (1999), que observaram segregação transgressiva na direção do genótipo tolerante ao frio ao avaliar o comportamento de uma população de retrocruzamento sob 15°C por 30 dias.

Tabela 3. Médias e desvio padrão de todas as características avaliadas para os genótipos de arroz utilizados como genitores da população IRGA 417 x Quilla 66304 e da população F<sub>2</sub>. UFRGS, 2003.

Características	Genitor 1	Genitor 2	F <sub>2</sub>
	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão
Recrescimento do coleóptilo (mm)	14,3 ± 4,2	8,8 ± 2,8	18,7 ± 7,9
Crescimento de plântulas (cm)	1,9 ± 0,8	0,9 ± 0,2	3,8 ± 3,1
Estatura das plantas (cm)	98,4 ± 3,7	87,5 ± 0,5	75,3 ± 14,9
Grau de exercício da panícula (cm)	3,4 ± 1,0*	-4,0 ± 0,8	-1,5 ± 2,7
Esterilidade de espiguetas (%)	5,4 ± 1,1*	10,8 ± 1,0	79,4 ± 16,7
Comprimento do grão (mm)	10,9 ± 0,3	10,2 ± 0,2	9,6 ± 0,6
Largura do grão (mm)	3,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,2
Relação comp./larg.	3,3 ± 0,1	4,2 ± 0,2	3,6 ± 0,3

\* Médias diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade

Estudos relativos às bases genéticas de tolerância ao frio na germinação foram realizados por Sasaki et al. (1973) apud Sthapit & Witcombe (1998) e Sasaki (1977) apud Takahashi (1997), os quais indicaram que a temperatura baixa no período de germinação do arroz foi controlada por quatro ou mais genes dominantes e que efeitos gênicos aditivos e dominantes estavam envolvidos. A possibilidade de segregação transgressiva, dependendo dos genitores envolvidos, também foi relatada. Ao estudar a herança da tolerância ao frio na germinação, por meio do recrescimento do coleóptilo em cinco genótipos de arroz, Cruz (2001) verificou, além da presença de efeitos gênicos aditivos, a existência de efeitos de dominância e epistasia na variação genética observada, os quais dificultam a seleção para o caráter em gerações iniciais. Contudo, a obtenção de segregantes nessa população com recrescimento de coleóptilo superior a três milímetros demonstra o potencial desse cruzamento para seleção de indivíduos superiores para tolerância ao frio em arroz.

No período vegetativo, a tolerância ao frio foi avaliada por meio do crescimento de plântulas, a qual apresentou novamente uma distribuição contínua na geração  $F_2$  e uma elevada segregação transgressiva em relação aos genitores (Figura 1). O genitor tolerante apresentou média de 1,9 cm para o crescimento de plântulas e o genitor sensível média de 0,9 cm, as quais não diferiram entre si (Tabela 3). Houve sobreposição de valores e conseqüentemente, pouca diferenciação entre os genitores quanto ao crescimento de plântulas (Figura 1). A maioria das plantas da população  $F_2$  apresentou crescimento de plântulas superior ao genitor tolerante com média de 3,8 cm, indicando dominância no sentido da tolerância (Figura 1).

Tanto na germinação como no período vegetativo os resultados foram semelhantes para a população  $F_2$ , indicando que essas características são de natureza quantitativa e que existem provavelmente vários genes de pequeno efeito controlando a tolerância ao frio nestes dois períodos de desenvolvimento da planta. A herança da tolerância ao frio no período vegetativo foi avaliada por Li & Rutger (1980) através da medição da estatura de plântulas submetidas a um estresse de frio ( $18^{\circ}\text{C}$ ) por 14 dias e evidenciou quatro a cinco genes responsáveis, com efeitos aditivos e de dominância envolvidos na expressão do caráter. Os resultados aqui obtidos corroboram com a hipótese de vários genes atuando em ambas características de tolerância ao frio avaliadas na população IRGA 417 x Quilla 63304. Além disso, a alta segregação transgressiva no sentido da maior tolerância ao frio para ambas as características é um indicativo que indivíduos segregantes superiores possam ser obtidos para o melhoramento dessa característica em arroz.

A estatura das plantas apresentou distribuição contínua na geração  $F_2$  e variou de 18,5 a 117,4 cm (Figura 1). A média da estatura foi de 75,3 cm e foi constatada segregação transgressiva sendo a distribuição no sentido do genitor mais baixo, IRGA 417. Os dois

genótipos genitores apresentaram uma leve sobreposição e, como esperado, o genitor Quilla 66304, pertencente à subespécie Japônica, apresentou estatura superior ao genitor da subespécie Índica, com médias de 98,4 cm e 87,5cm, respectivamente, as quais não diferiram entre si pelo teste de  $t$  (Tabela 3). A tendência da maioria das plantas  $F_2$  de apresentar estatura similar ao genitor Índica é desejável, uma vez que em cruzamentos desse tipo se quer introduzir apenas a tolerância ao frio dos genótipos Japônica e manter as demais características agrônômicas similares ao genitor da subespécie Índica adaptado.

Com relação ao grau de exercício da panícula, observou-se uma clara distinção entre os genitores, em que o genitor IRGA 417 apresentou exercício predominantemente negativa ou incompleta e o genitor Quilla 66304 valores positivos para o caráter, ou seja, exercício completa, as quais diferiram significativamente entre si pelo teste  $t$  (Tabela 3). Os dados de exercício da panícula para a geração  $F_2$  apresentaram uma distribuição contínua e a média  $-1,5$  cm da  $F_2$  tendeu àquela do genitor com exercício negativa (Figura 1).

A exercício da panícula foi avaliada no presente trabalho em condições normais de desenvolvimento para as plantas, uma vez que as mesmas foram mantidas em casa-de-vegetação. Mesmo nessas condições observaram-se diferenças entre os genitores, sendo que aquele pertencente à subespécie Índica apresentou exercício incompleta e o pertencente à subespécie Japônica apresentou exercício completa. Diferenças intrínsecas às duas subespécies com relação à exercício da panícula são conhecidas. Sabe-se que, de maneira geral, a subespécie Japônica se caracteriza pela exercício rápida e completa da panícula e a subespécie Índica pela exercício incompleta, porém a temperatura baixa agrava ainda mais o problema de exercício parcial nesta subespécie (Yoshida, 1981a). Alguns estudos relativos à genética do grau de exercício da panícula sob temperatura baixa foram realizados, tendo sido constatada uma base genética simples para o caráter, com a exercício completa condicionada por um gene dominante (Mahishi et al., 1991; Pandey & Gupta, 1993). Cruz

(2001), avaliando a exerceção da panícula no período reprodutivo do arroz sob condições de frio, verificou uma segregação contínua para a população  $F_2$  indicando ser de herança quantitativa, porém, quando os dados foram submetidos ao teste de Qui-quadrado verificou-se que a exerceção completa da panícula foi condicionada por um gene recessivo. No presente trabalho essa característica foi avaliada sob condições de ausência de estresse de frio e sendo assim, as diferenças de exerceção da panícula constatadas na população  $F_2$  foram decorrentes do cruzamento Índica x Japônica, indicando que essas existem entre os genótipos estudados independente da exposição ao frio.

Em relação à esterilidade de espiguetas foi constatada uma ampla variação na população  $F_2$ , sendo o menor grau de esterilidade 30,7% e o maior grau 99,9% (Figura 1). Este resultado comprova a problemática existente nos cruzamentos entre as subespécies Índica x Japônica, onde as populações provenientes destes cruzamentos apresentam elevadas porcentagens de esterilidade de espiguetas. O alto grau de esterilidade tem sido relatado também na geração  $F_1$  de cruzamentos entre cultivares Índica e Japônica, o que diminui o número de recombinantes obtidos e dificulta a transferência gênica entre essas duas subespécies. A esterilidade tem sido apontada como sendo decorrente de causas genéticas (Oka & Morishima, 1997). Nos genitores a porcentagem de esterilidade foi baixa, como esperada, porém suas médias diferiram significativamente (Tabela 3). Apesar desse ser um problema para obtenção de segregantes em cruzamentos desse tipo, foi possível identificar indivíduos transgressivos para características de tolerância ao frio, estatura e exerceção da panícula desejáveis a partir da população IRGA 417 x Quilla 66304. De fato, quatro indivíduos (4%) dos 93 avaliados na população  $F_2$  apresentaram recrescimento de coleóptilo superior a 25mm, exerceção positiva de panícula e estatura baixa, combinando características desejáveis para o melhoramento de arroz.



Em relação às características físicas dos grãos no RS, a preferência é por grãos longos finos, encontrados nos genótipos Índica adaptados e selecionados para esta característica, como é o caso do cultivar IRGA 417. No caso do genótipo Japônica utilizado, Quilla 66304, os grãos são longos e largos, adequados ao mercado consumidor do Chile, de onde o mesmo se origina. Assim, em relação ao comprimento dos grãos com casca houve uma sobreposição entre os genitores, ambos de grãos longos, sendo a média do IRGA 417 (10,2 mm) ligeiramente inferior a do Quilla 66304 (10,9 mm), as quais não diferiram significativamente (Tabela 3). A população  $F_2$  apresentou uma distribuição contínua com tendência a grãos de menor comprimento que os dois genitores e média de 9,6 mm. A segregação transgressiva no sentido do menor comprimento de grãos indica que genes com efeito menor devem estar envolvidos na determinação do caráter (Figura 1).

Em relação à largura dos grãos, houve diferença evidente entre os dois genitores, onde o genitor da subespécie Índica (IRGA 417) apresentou grãos finos com média de aproximadamente 2,5 mm, e o genitor da subespécie Japônica (Quilla 66304) apresentou grãos largos, com média de 3,3 mm, porém as médias não diferiram significativamente (Tabela 3). A maioria das plantas  $F_2$  apresentaram grãos intermediários, com uma largura média de 2,7 mm. A distribuição ficou próxima à continuidade e também houve segregação transgressiva em relação aos genitores, apesar dessa não ser tão pronunciada em comparação a observada para as outras características estudadas (Figura 1).

A relação comprimento/largura é uma característica que leva em consideração numa só variável, a forma do grão. Através da distribuição de frequências observou-se que o genitor Índica apresentou uma alta relação comprimento/largura (média de 4,2), característica de grãos longos e finos enquanto o genitor Japônica apresentou uma menor relação (média de 3,3), correspondente a grãos longos e largos (Tabela 3). Não houve diferença significativa para as médias dos genitores (Tabela 3). A população  $F_2$  tendeu à

média do genitor Japônica e apresentou média de 3,6, porém houve uma segregação transgressiva e a distribuição teve comportamento contínuo (Figura 1).

As análises das distribuições de frequências da geração F<sub>2</sub> evidenciaram a dificuldade de estimar o número de genes que controlam as características analisadas, sendo que todas elas apresentaram segregação transgressiva e distribuição próxima à continuidade em relação aos genitores. Esses resultados sugerem a presença de genes com efeito menor atuando sobre os caracteres, bem como a distribuição complementar de genes entre os genitores.

A estimativa do número de genes que controlam caracteres de importância agrônômica é de fundamental importância para determinar o tamanho da população onde será aplicada a seleção artificial em um programa de melhoramento genético. No presente trabalho, apesar dos dados terem apresentado distribuição próxima à continuidade, indicando a presença de genes com efeito menor, os mesmos foram submetidos ao teste de Qui-quadrado para verificar também a presença ou não de genes com efeito maior.

#### **4.2. Teste de Qui-quadrado**

O Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) é um teste estatístico não paramétrico utilizado para verificar se as frequências observadas ajustam-se às esperadas com base em uma hipótese.

Com base no agrupamento dos dados em classes para cada característica estudada foi possível verificar segregação mendeliana apenas para o grau de exercício da panícula.

Os dados da exercício da panícula da população F<sub>2</sub> foram divididos em duas classes, exercício completa e incompleta, com base no comportamento dos dois genitores, em que o pertencente à subespécie Índica apresentou exercício incompleta (valores iguais ou superiores a zero) e o pertencente à subespécie Japônica, exercício completa (valores maiores que zero). Num total foram avaliados para esta característica 74 plantas, sendo que

a frequência observada para a execução completa foi de 21 indivíduos e para a incompleta de 53 indivíduos. Já a frequência esperada apresentou uma média de 18,5 indivíduos com execução completa e 55,5 indivíduos com execução incompleta. Os dados não diferiram da segregação esperada de 3:1 (incompleta:completa) e assim um gene recessivo controlou a execução completa nesta população.

Estudos conduzidos para verificar a herança do caráter sob a influencia da temperatura baixa relataram um gene dominante como sendo responsável pela execução completa da panícula (Mahishi et al., 1991; Pandey & Gupta, 1993). Já Cruz (2001), trabalhando com duas populações distintas da avaliada no presente estudo, obteve resultado idêntico ao aqui obtido, onde um gene recessivo foi responsável pela execução completa da panícula. A herdabilidade variou de moderada a alta, conforme a população, e indicou, portanto, possibilidade de ganho genético por meio da seleção de genótipos com maior execução da panícula em condições de campo. Acharya (1987), por sua vez, também verificou, num estudo dialélico, que os alelos que aumentaram a execução da panícula foram, na sua maioria, recessivos. Os dados aqui obtidos indicam que o gene que atua para a execução da panícula em condições de frio possa ser o mesmo responsável pela característica em condições sem o estresse. Assim, apesar de conferir uma vantagem seletiva em condições de frio, a execução da panícula do genótipo Quilla 66304 é uma característica que independe do frio para se expressar.

#### **4.3. Estimativas de variâncias e herdabilidade**

Os dados relativos às estimativas de variâncias e herdabilidade encontram-se na Tabela 4. As estimativas de variância genética foram superiores às de variância ambiental para todas as características estudadas. Conseqüentemente, todas as características apresentaram elevados valores de herdabilidade no sentido amplo. Esses resultados

indicam que as características avaliadas podem ser selecionadas fenotipicamente em gerações precoces.

Tabela 4. Variância fenotípica (VP), variância ambiental (VE), variância genética (VG) e herdabilidade no sentido amplo ( $h^2a$ ) para as características fenotípicas no cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304. UFRGS, 2003.

Características	Variâncias			
	VF	VE	VG	$h^2a$
Recrescimento do coleóptilo	62,2	4,65	57,5	0,92
Crescimento de plântulas	9,6	0,35	9,25	0,96
Estatura	223,5	7,0	216,5	0,97
Exerção	7,5	0,75	6,75	0,90
Esterilidade	279,2	1,1	278,1	0,99
Comprimento do grão	0,4	0,1	0,3	0,75
Largura do grão	0,1	0,0	0,1	1,0
Relação comp/larg	0,1	0,0	0,1	1,0

Para as demais características avaliadas, porém, não foi possível estabelecer o número de genes envolvidos por meio do agrupamento dos dados em classes. Assim, a herdabilidade parece estar super estimada devido a baixa variação ambiental obtida a partir de amostras limitadas de indivíduos de cada genitor (Tabela 4).

No caso da tolerância ao frio na germinação, outros autores já relataram a existência de vários genes controlando o caráter (Sasaki et al., 1973 apud Sthapit & Witcombe, 1998; Sasaki, 1977 apud Takahashi, 1997; Cruz, 2001), porém no período vegetativo a tolerância ao frio, avaliada por meio do grau de amarelecimento de plântulas e da porcentagem de sobrevivência, apresentou base genética simples, tendo sido relatado um gene dominante de tolerância à descoloração foliar (Shahi & Khush, 1986; Nagamine & Nakagahra, 1991). No presente trabalho, a tolerância ao frio no período vegetativo foi avaliada por meio do crescimento de plântulas sob temperatura baixa e, por isso, os resultados podem ter sido distintos.

Independente da alta herdabilidade obtida para as características estudadas, a associação de marcadores moleculares às mesmas por meio da técnica de mapeamento é importante, pois permite, por exemplo, que a seleção seja realizada antes do caráter se manifestar fenotipicamente, como é o caso das características físicas dos grãos. E no caso da tolerância ao frio a alta herdabilidade nos dois períodos de desenvolvimento estudados sugere que bons progressos devem ser obtidos via seleção fenotípica do caráter. No entanto, a associação de marcadores moleculares é importante, pois a seleção para a tolerância ao frio a campo apresenta limitações e baixa eficiência por não se ter controle sobre a época e duração do estresse. Assim, para características de difícil seleção a campo, o uso de ferramentas moleculares pode auxiliar de forma decisiva na rotina dos programas de melhoramento e, por isso, a construção de mapas moleculares e o mapeamento de características de importância agrônômica é um passo fundamental.

#### **4.4. Construção do Mapa Molecular**

A construção do mapa molecular, através de marcadores SSR e AFLP, foi feita utilizando-se os 93 indivíduos da população  $F_2$  proveniente do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304.

Cinquenta pares de *primers* SSRs e sete combinações de *primers* AFLP (MseI/EcoRI) foram utilizados para a análise molecular. Dos cinquenta pares de *primers* SSRs testados, somente 25 foram polimórficos entre os genitores e apresentaram padrão de amplificação adequado para permitir uma análise confiável na população  $F_2$ . Assim, apenas 25 locos polimórficos SSR foram utilizados para a construção do mapa. Para as sete combinações AFLP, foram detectados em média, 11,6 locos polimórficos por combinação de *primers* (dados não mostrados). As combinações que detectaram maior número de locos polimórficos entre os genitores, e que segregaram na população, foram M-CAA/E-AAG (15 polimorfismos) e M-CCA/E-AGG (15 polimorfismos). A combinação que detectou

menor número de polimorfismos entre os genótipos avaliados foi M-CCT/E-AAC (sete polimorfismos).

No total foram identificados 108 marcadores moleculares, sendo 25 SSRs e 83 marcadores AFLP, porém, desses, apenas 50 foram integrados ao mapa molecular (46,1%), oito SSRs e 42 marcadores AFLP, através do programa computacional Mapmaker/Exp 3.0, sendo distribuídos em 15 grupos de ligação (Figura 2). O principal motivo pelo qual apenas a metade dos marcadores tenham sido integrada ao mapa, é que no presente trabalho o LOD (*likelihood of odds*) utilizado para a construção do mapa foi fixo, ou seja, um LOD com valor de 6,0 foi utilizado para agrupar os marcadores.

O valor do LOD indica a taxa de probabilidade de haver ou não uma associação significativa entre marcadores ou entre um marcador e um QTL em um ponto em particular (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Na maioria dos trabalhos tem se utilizado mais de um valor de LOD, geralmente um LOD para construir o mapa e outro para tentar agrupar os marcadores que permaneceram não ligados. Andaya & Mackill (2003) utilizaram LOD 5,0 para construir um mapa de arroz e em seguida diminuíram o LOD até 1,0 com o intuito de agrupar os marcadores restantes. Porém, naquele trabalho o número de marcadores utilizados e a população segregante foram maiores do que aqui utilizados. Ainda, os marcadores utilizados pelos autores estavam todos mapeados no mapa físico do arroz, o que diminui a chance de construir um mapa irreal da espécie.

No presente trabalho optou-se por utilizar LOD fixo porque a maioria dos marcadores utilizados foi do tipo AFLP e, esses não estão mapeados no mapa físico da espécie. Essa opção foi feita para aumentar a confiabilidade do mapa obtido, pois quanto maior o LOD mais confiável e preciso é o mapa construído, e assim o procedimento adotado neste trabalho objetivou evitar a detecção incorreta de QTLs.

Os grupos de ligação apresentaram de dois a nove marcadores (média = 3,3) e variaram em tamanho de 0 a 185,8 cM, com média de 38,8 cM, em um mapa total de 581,6 cM (Tabela 5). Verificou-se que a extensão encontrada neste mapa não abrangeu a extensão encontrada por outros autores. Por exemplo, no mapa construído por Cho et al. (1998) utilizando marcadores SSR o tamanho estimado foi de 1814 cM, enquanto Temnykh et al. (2000) construiu um mapa de tamanho aproximando de 1822 cM. Recentemente, Andaya & Mackill (2003), construíram um mapa usando linhagens recombinantes baseado em um cruzamento Índica x Japônica para a tolerância ao frio no período reprodutivo com tamanho de 1277 cM. Já Suh et al. (1999), ao construir um mapa a partir de marcadores morfológicos, isoenzimáticos, RFLP, RAPD e SSR em uma população de retrocruzamento, obtiveram tamanho de 1640 cM. Sabe-se que o tamanho do mapa depende do número de marcadores utilizados no mapeamento e do tamanho da população. O grande número de locos que permaneceram não ligados após o cálculo do mapa de ligação (58 locos), demonstra novamente que o número de marcadores obtidos foi insuficiente para abranger todo o genoma do arroz. Apesar de inicialmente terem sido escolhidos dois marcadores de SSR por braço de cromossomo, indicando estarem eles distribuídos por todo o genoma da espécie, apenas 25 locos de SSR foram polimórficos entre os genitores e desses somente oito foram efetivamente integrados ao mapa molecular.

Os marcadores SSR apresentam a vantagem de estarem mapeados no genoma do arroz, e isso possibilita a comparação dos grupos de ligação encontrados neste trabalho com o mapa físico da espécie, segundo Chen et al. (1997). Assim, apesar de se ter escolhido marcadores de SSR que abrangessem todos os 12 cromossomos de arroz, apenas oito foram efetivamente integrados ao mapa, os quais correspondem a quatro cromossomos de arroz (Tabela 5).

Tabela 5. Número de marcadores utilizados para a construção do mapa por grupo de ligação, comprimento em cM e localização cromossômica dos grupos de ligação no mapa físico do arroz. UFRGS, 2003.

<b>Grupos de ligação</b>	<b>Número de marcadores</b>	<b>Comprimento do cromossomo (cM)</b>	<b>Localização cromossômica</b>
1	2	29,6	-
2	8	126,8	-
3	3	31,3	-
4	2	0,0	-
5	3	29,5	11
6	9	185,8	5
7	2	25,5	-
8	3	24,7	-
9	2	0,0	-
10	3	24,0	-
11	2	11,5	-
12	2	0,0	-
13	3	34,1	-
14	4	58,8	9
15	2	0,0	12
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>581,6</b>	

- dado não disponível.

No caso dos marcadores AFLP, os mesmos não são mapeados e por isso não se sabe a sua localização no genoma. No entanto, foram escolhidos para o mapeamento por ser uma das tecnologias mais eficientes para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares, principalmente em espécies cultivadas que apresentam baixa taxa de polimorfismo de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O número de locos detectados e o curto período de tempo disponível para a execução das análises moleculares foram limitantes para a obtenção de um maior número de marcadores e como conseqüência um mapa mais saturado. Assim, com a adição de mais marcadores nesse mapa, será possível preencher os intervalos entre os já agrupados e obter uma maior cobertura do genoma.



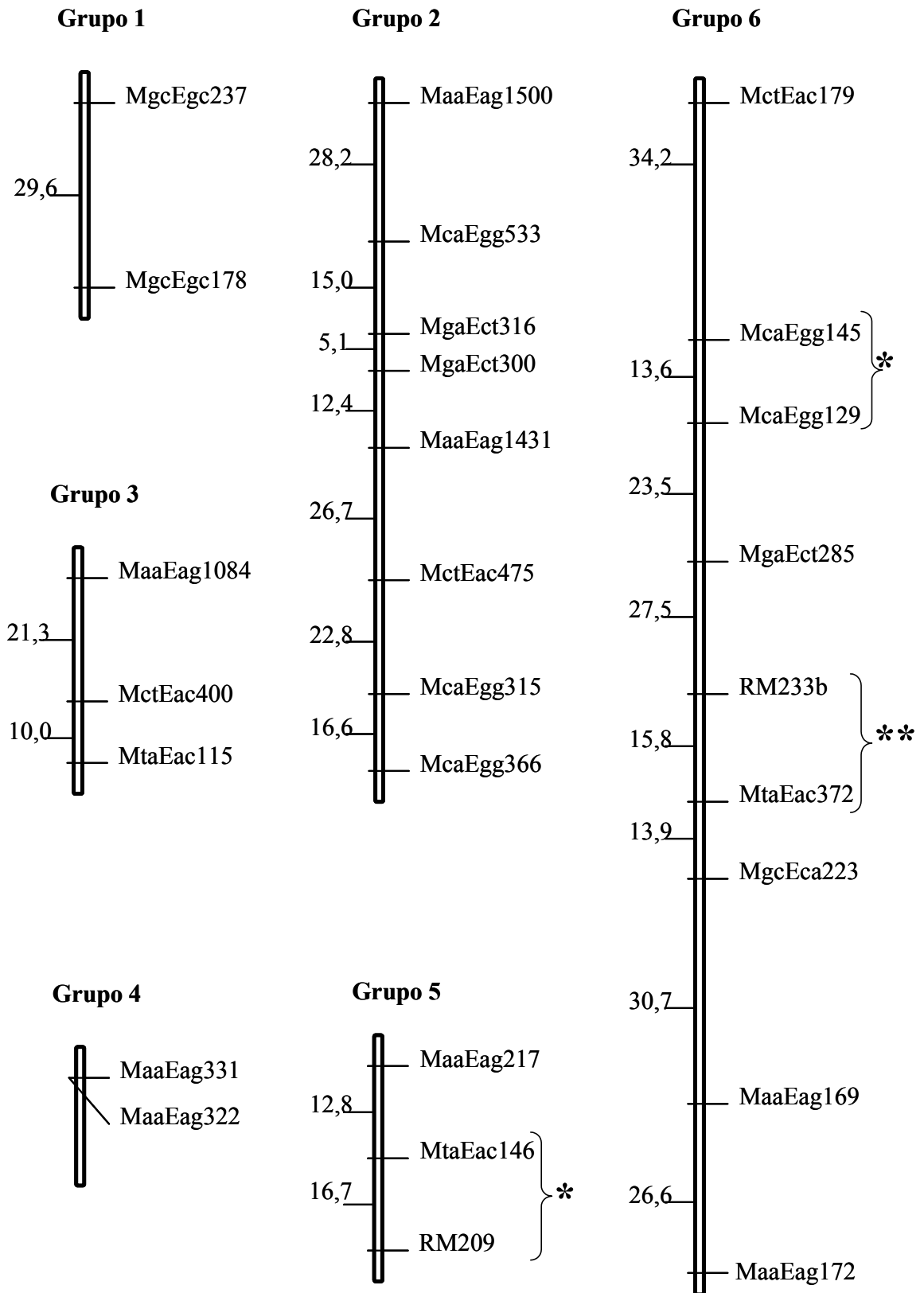


Figura 2. Mapa de ligação molecular de arroz baseado na população  $F_2$  do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304. Distâncias no mapa são dadas em centimorgans. LOD 6. QTLs são identificados por asterisco (\* - um QTL; \*\* - dois QTLs). UFRGS, 2003.

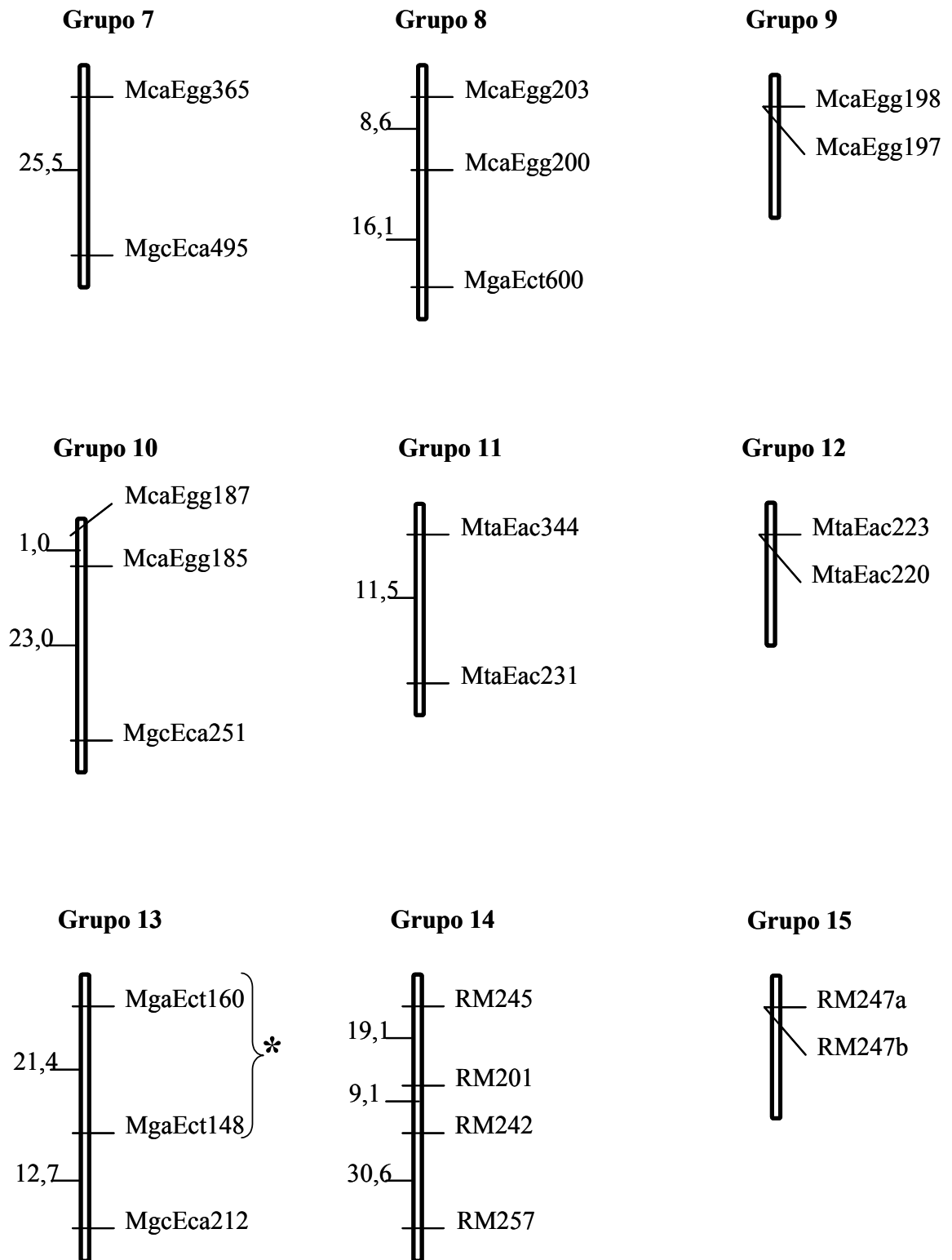


Figura 2. Mapa de ligação molecular... (continuação)

A população mapeada, por ser  $F_2$ , apresenta ampla variabilidade genética, mas também a desvantagem de poder ser avaliada fenotipicamente apenas uma vez. Por outro lado, por ter sido submetida apenas a um ciclo de recombinação, a população  $F_2$  apresenta a vantagem de manter blocos de ligação intactos, facilitando a integração dos marcadores em grupos de ligação. Assim, o mapa obtido no presente trabalho servirá de ponto de partida e referência para a obtenção de um mapa mais saturado dessa população  $F_2$ , bem como de uma população de linhas recombinantes  $F_6$  derivada da mesma. As vantagens no uso de população de linhagens endogâmicas recombinantes para o mapeamento, que incluem obtenção de dados fenotípicos em diferentes ambientes e para várias características (Oliveira, 1998), tem tornado cada vez mais comum o uso dessa no mapeamento de diferentes espécies (Burr et al., 1988; Andaya & Mackill, 2003).

#### **4.5. Detecção de QTLs para as características avaliadas**

Com base nos dados moleculares e fenotípicos para a população  $F_2$  foram identificados cinco QTLs, sendo um QTL para o recrescimento do coleóptilo, um para a estatura, um para o comprimento do grão, um para a largura do grão e um QTL para esterilidade de espiguetas (Figura 2, Tabela 6). Não foram detectados QTLs para as demais características avaliadas.

Três desses QTLs (esterilidade, estatura e comprimento do grão) foram identificados no grupo de ligação número seis, um QTL (largura do grão) no grupo de ligação cinco e um QTL (recrescimento do coleóptilo) no grupo de ligação 13 (Tabela 6).

A largura do grão foi controlada por um QTL localizado no grupo de ligação cinco, na região do marcador *MtaEca146*, a 16 cM de distância do mesmo, e explicou 21,3% da variação fenotípica no caráter. Esse marcador foi detectado pela combinação de *primers* M-CTA/E-ACA, apresentando tamanho aproximado de 146 pb e em associação com o caráter de interesse, ou seja, ocorreu presença da banda em indivíduos com grãos

mais finos e ausência de banda em indivíduos com grãos mais largos. Com base no efeitos de aditividade (Tabela 6), verificou-se que a direção do efeito fenotípico para esse QTL foi no sentido do genitor IRGA 417. Esse resultado é desejável, pois o que se quer são grãos mais finos, os quais são provenientes da subespécie Índica, uma vez que a subespécie Japônica apresenta, na sua maioria, grãos largos.

Tabela 6. Locos quantitativos (QTLs) identificados na população F<sub>2</sub> proveniente do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304. UFRGS, 2003.

QTLs	Característica	Marcador (posição em cM) <sup>1</sup>	Grupo de Ligação	Aditividade	Dominância	Variação (%)	LOD <sup>2</sup>
1	Largura do grão	MtaEca146 (16,0)	5	-0,09	-0,08	21,3	2,6
2	Esterilidade de espiguetas I x J	McaEgg145 (8,0)	6	-0,16	-2,9	61,6	3,6
3	Estatuta das plantas	RM233b (6,0)	6	14,03	-26,27	34,5	4,3
4	Comprimento do grão	RM233b (0,0)	6	-0,52	0,03	21,9	2,8
5	Recrescimento do coleóptilo	MgaEct160 (6,0)	13	3,13	1,4	15,9	2,5

<sup>1</sup> posição do marcador em relação ao QTL

<sup>2</sup> log da taxa de probabilidade de haver ou não haver um QTL em um ponto particular

O segundo QTL identificado foi para a esterilidade de espiguetas e localizou-se próximo ao marcador *McaEgg145*, a 8,0 cM de distância e explicou 61,6% da variação (Tabela 6). Esse marcador foi detectado pela combinação dos *primers* M-CCA/E-AGG e apresentou tamanho aproximado de 145 pb. Esse QTL apresentou-se em associação com o caráter de interesse, sendo que houve presença de banda nos indivíduos com porcentagem de esterilidade mais baixa. O fato desse QTL ter apresentado grande efeito no fenótipo corrobora com os dados anteriores que revelaram ser a porcentagem de esterilidade uma característica oligogênica e de alta herdabilidade.

O terceiro e o quarto QTL localizaram-se próximos ao marcador *RM233b*, sendo o terceiro QTL a 6,0 cM de distância do marcador e o quarto a 0,0 cM. Esse marcador apresentou tamanho aproximado de 171 pb. O terceiro QTL foi para a estatura e explicou 34,5% da variação fenotípica no caráter. A direção do efeito fenotípico desse QTL foi no sentido do genitor Quilla 66304, verificado com base no valor da aditividade (Tabela 6).

Apresentou-se em associação com o caráter de interesse, ou seja, houve presença de bandas em indivíduos com estaturas mais baixas e ausência de bandas em indivíduos com alta estatura.

O quarto QTL foi para o comprimento do grão e explicou 21,9% da variação fenotípica. Esse QTL apresentou-se em repulsão ao caráter de interesse, sendo que houve presença de banda para indivíduos com grãos mais curtos e ausência de banda para indivíduos com grãos mais longos. Com base no efeito de aditividade, pode-se verificar que a direção do efeito fenotípico desse QTL foi no sentido do genitor IRGA 417 (Tabela 6), que apresenta grãos de menor comprimento que o Quilla 66304.

Em relação às características de tolerância ao frio avaliadas, foi detectado um QTL para o recrescimento do coleóptilo, o qual se localizou no grupo de ligação 13, próximo ao marcador *MgaEct160*, a uma distância de 6,0 cM. Este marcador foi detectado pela combinação dos *primers* M-CGA/E-ACT, apresentando tamanho aproximado de 160 pb. Esse QTL explicou 15,9% da variação e encontra-se em repulsão ao caráter de interesse, sendo a presença de banda em indivíduos com menor recrescimento do coleóptilo e a ausência de bandas em indivíduos com valores maiores do recrescimento do coleóptilo. A direção do efeito fenotípico desse QTL foi em direção ao genitor tolerante ao frio (Quilla 66304), identificado com base no valor de aditividade para este caráter (Tabela 6). Esse resultado é semelhante ao obtido por Suh et al. (1999) que encontraram três QTLs associados à germinação sob baixa temperatura, os quais explicaram, individualmente, de 11,4 a 18,6% da variação fenotípica.

Neste trabalho esperava-se inicialmente detectar várias regiões genômicas associadas à tolerância ao frio, por ser esta uma característica de herança quantitativa. No entanto, foi detectado um QTL de pequeno efeito associado à tolerância ao frio no período de germinação. A causa mais provável disso foi a abrangência parcial do mapa construído

no presente trabalho, o que diminuiu a chance de serem detectados QTLs significativos e associados aos caracteres de interesse. Não obstante, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado com base no conhecimento teórico a respeito das bases genéticas das características avaliadas e com base na distribuição de frequência das mesmas na população  $F_2$ . Essas indicaram que vários genes de pequeno efeito estão controlando as características estudadas, e com exceção da esterilidade de espiguetas, todos os QTLs detectados para as características explicaram, de fato, pouco da variação fenotípica observada (Tabela 6).

Há na literatura, relatos de marcadores ligados a genes de efeito maior e menor de tolerância ao frio em arroz. Saito et al. (1995) identificaram segmentos nos cromossomos 3 e 4 que controlam tolerância ao frio no estágio de microsporogênese no cultivar Norin-PL8, os quais foram introgrididos de um cultivar Japônica tropical da Indonésia, denominado Silewah. Li et al. (1997) identificaram dois QTLs nos cromossomos 1 e 12 que foram associados com a esterilidade induzida por baixa temperatura no estado heterozigoto em híbridos Índica-Japônica. Takeuchi et al. (2001) identificaram QTLs para tolerância ao frio no período reprodutivo nos cromossomos 1, 7 e 11 em uma população duplo-haplóide proveniente de um cruzamento entre dois cultivares Japônicas temperados.

Recentemente, Andaya & Mackill (2003) identificaram oito QTLs para a tolerância ao frio no estágio de microsporogênese utilizando linhagens recombinantes derivadas de um cruzamento Índica x Japônica. A contribuição fenotípica dos QTLs encontrados variou de 11 a 17% , indicando que a tolerância ao frio no estágio reprodutivo provavelmente é controlado por vários genes de pequeno efeito.

Dos cinco QTLs identificados no presente trabalho, quatro puderam ser localizados no mapa físico da espécie (Tabela 5), sendo que o QTL para a largura dos

grãos, localizado no grupo de ligação cinco do presente trabalho, encontra-se no cromossomo 11 da espécie. Os QTLs para esterilidade de espiguetas, estatura das plantas e comprimento dos grãos foram identificados no grupo de ligação seis que corresponde ao cromossomo cinco no mapa físico do arroz. Este resultado comprova a importância de se utilizar marcadores já localizados no mapa físico da espécie, pois a partir dessa informação é possível utilizar outros marcadores localizados nestes mesmos cromossomos para realizar o mapeamento fino destas características e permitir sua seleção assistida.

É importante enfatizar que as análises feitas neste trabalho referem-se à população proveniente do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304, e os resultados obtidos são exclusivos para esse cruzamento. Assim, este é um trabalho pioneiro no sul do Brasil e como o cultivar pertencente à subespécie Índica utilizado no mapeamento foi desenvolvido aqui, os resultados obtidos são ponto de partida para melhor compreensão da genética das fontes de tolerância ao frio disponíveis e utilizadas pelo Programa de Melhoramento de Arroz do IRGA. Além disso, o mapa desenvolvido no presente trabalho servirá de base para a construção de mapa similar utilizando população de linhas recombinantes avançadas do mesmo cruzamento e poderá ser utilizado para o mapeamento de outros caracteres de importância agrônômica.

## 5. CONCLUSÕES

As características de tolerância ao frio no período de germinação e vegetativo, estatura de planta, grau de exerceção de panículas, comprimento e largura dos grãos com casca e relação comprimento/largura dos grãos com casca apresentaram distribuição próxima à continuidade, a segregação transgressiva em relação aos genitores e os elevados valores de herdabilidade no sentido amplo observados indicam que progresso significativo pode ser obtido via seleção fenotípica para as mesmas na população segregante  $F_2$  do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304 de arroz.

O mapa genético de ligação construído para a população  $F_2$  do cruzamento IRGA 417 x Quilla 66304 apresenta uma baixa densidade de marcadores SSR e de AFLP e, devido ao número de indivíduos  $F_2$  e marcadores usados, o número de grupos de ligação obtidos é superior ao número de cromossomos do arroz.

O QTL identificado para a característica de tolerância ao frio no período de germinação, explicando 15,9% corrobora com a natureza quantitativa da mesma. A característica de tolerância ao frio medida pelo recrescimento de coleóptilo pode ser identificada em indivíduos com estatura baixa de planta e exerceção completa de panícula da população  $F_2$  de IRGA 417 x Quilla 66304, o que confirma a possibilidade de obtenção de indivíduos recombinantes na mesma, apesar do alto grau de esterilidade proveniente da natureza do cruzamento Índica x Japônica.



Os QTLs identificados para a estatura de planta, largura e comprimento do grão, explicam de 21,3 a 34,5% da variação fenotípica das mesmas e, por serem de pequeno efeito no fenótipo, corroboram com a natureza quantitativa dessas características. Por outro lado, a identificação de um QTL de efeito maior, que explica 61,6% da variação fenotípica para a característica esterilidade de espiguetas, confirma a natureza oligogênica da mesma.

A população F<sub>2</sub> do cruzamento entre os genótipos de arroz IRGA 417 (Índica) e Quilla 66304 (Japônica) tem potencial para o melhoramento para tolerância ao frio de genótipos de arroz adaptados ao Sul do Brasil.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S. Genetic parameters and their implication in breeding cold tolerant varieties of rice (*Oryza sativa* L.). **Crop Improvement**, Ludhiana, v.14, n.1, p.100-103, 1987.

AKAGI, H. et al. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.93, n.1, p.1071-1077, 1996.

AKKAYA, M. S. et al. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in Soybean. **Genetics**, Austin, v.132, p.1131-1139, 1992.

ALLARD, R. W. **Principles of Plant Breeding**. New York: J. Wiley, 1960. 485p.

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, p.1084-1090, 2003.

AZAMBUJA, I. H. V.; FAGUNDES, P. R. R.; MAGALHÃES Jr. A. M. de. Importância sócio-econômica da lavoura de arroz irrigado. In: MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de; FAGUNDES, P. R. R. (Coords.) **Agricultura real: arroz irrigado**. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1996. p.7-8. (EMBRAPA-CPACT. Documentos, 20).

BARBOSA, M. M. **Genética e mapeamento molecular da resistência parcial à ferrugem da folha da aveia (*Avena sativa* L.)**. 2002. 115 f. Tese (Doutorado) em Fitotecnia – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

BECKMANN, J. S.; SOLLER, M. Towards a unified approach to genetics mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Bio/Technology**, New York, v.8, p.930-932, 1990.

BERTIN, P.; BOUHARMONT, J. Use of somaclonal variation and in vitro selection for chilling tolerance improvement in rice. **Euphytica**, Wageningen, v.96, p.135-142, 1997.

BRONDANI, C. et al. Development and mapping of *Oryza glumaepatula* – derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *Oryza sativa*. **Hereditas**, Copenhagen, v.134, n.1, p.59-71, 2001.

BURR, B. et al. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, Austin, v.118, p.519-526, 1988.

- CAUSSE, M. A. et al. Saturated molecular map of the rice genome based on interspecific backcross population. **Genetics**, Austin, v.138, p.1251-1274, 1994.
- CHANG, T.T. Rice. In: SIMMONDS, N.W. (Ed.) **Evolution of Crop Plants**. New York: Longman, 1996. 148p.
- CHEN, X. et al. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.553-567, 1997.
- CHO, Y. G. et al. Integrated map of AFLP, SSLP and RFLP markers using a recombinant inbred population of rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p.370-380, 1998.
- CHUNG, G. S. **Report of a rice cold tolerance Workshop**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1979. p.7-19: The rice cold tolerance program in Korea.
- CRUZ, R. P. da. **Bases genéticas da tolerância ao frio em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2001. 155 f. Tese (Doutorado) em Fitotecnia – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- CRUZ, R. P. da; 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.
- DATTA, D.; SIDDIQ, E. A. Genetics analysis of cold tolerance at seedling phase in rice. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v.43, p.345-349, 1983.
- FERRAZ, E. C. Ecofisiologia do arroz. In: CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. (Eds) **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1987. p.185-202.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p. (EMBRAPA-CENARGEM. Documento 20).
- FORNASIERI FILHO, D.; FORNASIERI, J.L. **Manual da cultura do arroz**. Jaboticabal: Funep, 1993. 221p.
- GARLAND, S.H. et al. The use of microsatellite polymorphism for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v.108, p.53-63, 1999.
- 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, 2002.
- HAMDANI, A.R. **Report of Rice Cold tolerance Workshop**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1979. p.39-48: Low-temperature problems and cold tolerance research activities for rice in India.
- HARUSHIMA, Y. et al. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population. **Genetics**, Austin, v.148, p.479-494, 1998.

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, p.694-698, 1986.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenetics**, [s.l], v.12, p.172-175, 1944.

LANDER, E. S. et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural population. **Genomics**, Ottawa, v. 1, p. 174-181, 1987.

LI, C. C., RUTGER, 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.

LI, H. B. et al. Genetic basis of low-temperature-sensitive sterility in indica-japonica hybrids of rice as determined by RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.1092-1097, 1997.

LI, Z-K. QTL mapping in rice: a few critical considerations. In: KHUSH, G. S.; BRAR, D. S.; HARDY, B. (ed.). **Rice Genetics IV**. Los Baños, International Rice Research Institute, 2001. p.153-171.

LITT, M; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetics**, Austin, v.44, p.398-401, 1989.

LOPES, M. C. B. **Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de arroz irrigado**. 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002a.

LOPES, S. I. G. **Avaliação dos parâmetros genéticos da população de arroz irrigado CNA 11 e da divergência genética entre os genitores**. 2002. 101 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002b.

LOURIEUX, M. et al. A first interspecific *Oryza sativa* X *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.593-601, 2000.

MACKILL, D. J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Science**, Madison, v.35, p.889-894, 1995.

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.

MACKILL, D. J.; COFFMAN, W. R.; GARRITY, D. P. **Rainfed lowland rice improvement**. Manila: International Rice Research Institute, 1996. 242p.

MAHISHI, D. M. et al. Inheritance of panicle exertion in *Oryza sativa* under low temperature. In: INTERNATIONAL RICE GENETICS SYMPOSIUM, 2., 1991, Los Baños. **Proceedings...** Los Baños: International Rice Research Institute, 1991. p.175-177.

MATSUO, T. Origin and differentiation of cultivated rice. In: MATSUO, T. et al. (Ed.) **Science of the Rice Plant**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v.3: Genetics, p.69-111.

McCOUCH, S. R. et al. Molecular mapping of rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.76, p.815-829, 1988.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 140p.

MILACH, S.C.K.; CRUZ, R.P. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, p.685-689, 1997.

MILACH, S.C.K. et al. Mapeamento de características agronômicas de interesse em cereais de inverno. In: BRAMER, S.P; IORCZESKI, E. J. **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo. *in press*.

MOHAN, M. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.3, p.87-103, 1997.

MUDGE, J. et al. Two microsatellite markers that flank the major cyst nematode resistance locus. **Crop Science**, Madison v.36, n.5, p.1611-1615, 1997.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.55, p.335-150, 1987.

MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, New York, v.8, p.4321-4325, 1980.

NAGAMINE, T.; NAKAGAHARA, M. Genetic control of chilling injury in rice seedlings detected by low-temperature treatment. In: INTERNATIONAL RICE GENETICS SYMPOSIUM, 2., 1991, Los Baños. **Proceedings...** Los Baños: International Rice Research Institute, 1991. p.737-739.

NAGASAWA, N. et al. Cool-temperature sensitive mutants at the booting stage of rice. **Breeding Science**, Tokyo, v.44, p.53-57. 1994.

OKA, H-I. Intervarietal variation and classification of cultivated rice. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v.18, p.79-89, 1958.

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

OLIVEIRA, H. T. de. **Climatologia das temperaturas mínimas e probabilidade de ocorrência de geadas no Estado do Rio Grande do Sul**. 1997. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

OLIVEIRA, A. C. de. Construção de mapas genéticos em plantas. In: MILACH, S. C. K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. p.41-48.

PANAUD, O. et al. Development of microsatellite and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General Genetics**, New York, v.252, p.597-607, 1996.

PANDEY, D. K.; GUPTA, H. S. Genetics of panicle exertion in cold tolerance rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Breeding**, Berlin, v. 111, p.82-85, 1993.

PROMEGA CORPORATION. **Silver Sequence™ DNA sequencing system technical manual**. Madison: Promega, 1986. 19p.

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, London, v.9, n.8, p.275-280, 1993.

SAITO, A. et al. Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. **Japan Journal Breeding**, [s.l], v.41, p.665-670, 1991.

SAITO, K. et al. Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'norin-PL8'. **Breeding Science**, Tokyo, v.45, n.3, p.337-340, 1995.

SANO, Y. Inheritance of physiological characters. In: MATSUO, T. et al. (Ed.) **Science of the rice plant**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v.3: Genetics, p.367-376.

SHAHI, B. B.; KHUSH, G. S. Genetic analysis of cold tolerance in rice. In: INTERNATIONAL RICE GENETICS SYMPOSIUM, 1986, Los Baños. **Proceedings...** Los Baños: International Rice Research Institute, 1986. p.429-435.

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.

STEEL, R. D. G.; TORRIE, J. L. **Principles and procedures of statistical**. New York: McGraw-Hill, 1980. 418p.

STEINMETZ, S. Zoneamento agroclimatológico da cultura do arroz irrigado no estado do Rio Grande do Sul: recomendação de épocas de semeadura por município. In: MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de; FAGUNDES, P. R. R. (Coords.) **Agricultura real: arroz irrigado**. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1996. p.9-18. (EMBRAPA-CPACT. Documentos, 20).

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

SUH, J. P. et al. QTL analysis of low temperature germinability in a Korean weedy rice (*Oryza sativa* L.). In: SANO, Y. et al. (Coords) **Rice Genetics Newsletter**. Japan: Rice Genetics Cooperative, 1999. p.53-55.

TAKAHASHI, N. Inheritance of seed germination and dormancy. In: MATSUO, T. et al. (Ed) **Science of the Rice Plant**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. v.3: Genetics, p.348-359.

TAKEUCHI, Y. et al. Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at the booting stage in temperate japonica rice. **Breeding Science**, Tokyo, v.51, p.191-197, 2001.

TEMNYKH, S. et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.697-712, 2000.

TEMNYKH, S. et al. Computational and experimental analysis of microsatellite in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research**, Plainview, v.11, n.8, p.1441-1452, 2001.

TERRES, A. L. Melhoramento de arroz irrigado para tolerância ao frio no Rio Grande do Sul – Brasil. In: REUNIÓN SOBRE MEJORAMIENTO DE ARROZ EN EL CONO SUR, 1991, Goiânia. **Trabajos...** Montevideo: IICA – PROCISUR, 1991. p.91-103. (Diálogo/IICA – PROCISUR, 33).

TERRES, A.L.; GALLI, J. Efeitos do frio em cultivares de arroz irrigado no Rio Grande do Sul – 1984. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária de Terras baixas de Clima Temperado, Capão do Leão, RS. **Fundamentos para a cultura do arroz irrigado**. Campinas: Fundação Cargill, 1985. p. 83-94.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, New York, v.23, p.4407-4414, 1995.

WU, K-S. et al. Abundance, polymorphism and genetics mapping of microsatellites in rice. **Molecular & General Genetics**, New York, v.241, n.1-2, p.225-235, 1993.

XU, J. et al. Classification of rice germplasm. II. Discrimination of indica from japônica via analysis of amplicon length polymorphisms. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, n.8, p.640-645, 1998.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1981a. p.1-63: Growth and Development of the Rice Plant.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: International Rice Research Institute, 1981b. p.65-110: Climatic Environment and its Influence.

ZHU, J. et al. AFLP markers for study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, p.602-611, 1998.