

VARIAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR ENTRE SEIS GENÓTIPOS DE ARROZ USADOS NO ESTUDO DA TOLERÂNCIA AO FRIO

Renata Pereira da Cruz ⁽¹⁾, Sandra C. K. Milach ⁽¹⁾. 1. UFRGS/Faculdade de Agronomia, Departamento de Plantas de Lavoura, Caixa Postal 776, CEP 91501-970 - Porto Alegre -RS. E-mail: rfcruz@cpovo.net

A tolerância ao frio é uma característica desejável em genótipos de arroz irrigado cultivados na região sul do Rio Grande do Sul, onde a ocorrência de temperaturas abaixo de 20°C prejudica tanto o estabelecimento da cultura como o rendimento de grãos. No entanto, a complexa base genética do caráter aliada à dificuldade de seleção em condições de campo limitam os progressos a nível de melhoramento, tornando interessante o uso de marcadores moleculares para seleção assistida do caráter, os quais são independentes do ambiente e estágio de desenvolvimento da planta. Para o mapeamento da tolerância ao frio é essencial a existência de uma população segregante proveniente do cruzamento entre um genitor tolerante e outro sensível. Além disso, quanto maior for a distância genética entre os genitores da população de mapeamento, maiores são as chances de se detectar polimorfismos a nível de DNA passíveis de estarem associados à tolerância ao frio. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo identificar a população mais adequada para o mapeamento da tolerância ao frio com base na reação à temperatura baixa de seis genótipos de arroz em três estádios de desenvolvimento e na variabilidade molecular avaliada por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Seis genótipos de arroz foram estudados (Quilla 64117, Quilla 66304, Diamante, Irga 417, Embrapa 7 – Taim e IR 8), sendo os três primeiros pertencentes à subespécie Japônica e provenientes do Programa de Melhoramento Genético do INIA – Quilamapu, no Chile, e os três últimos pertencentes à subespécie Indica e provenientes dos Programas de Melhoramento Genético do IRGA (Instituto Riograndense do Arroz), Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e IRRI (International Rice Research Institute), respectivamente.

A tolerância ao frio na germinação foi avaliada por meio da porcentagem de redução no comprimento do coleóptilo pelo frio (REDCOL) e pelo recrescimento do coleóptilo (RECRESC). A REDCOL foi obtida submetendo-se as sementes dos genótipos à germinação sob duas condições: 13°C por 28 dias (frio) e 28°C por sete dias (controle) e medindo-se o comprimento do coleóptilo das sementes, em mm, nas duas situações e calculando-se a porcentagem de redução no comprimento pela germinação sob temperatura baixa. O RECRESC foi obtido submetendo-se as sementes à germinação sob temperatura variável, tendo sido utilizado: 28°C por 72 horas, 13°C por 96 horas e novamente 28°C por mais 72 horas. O comprimento do coleóptilo foi medido após o período de 96 horas a 13°C e após o segundo período de 72 horas a 28°C e a avaliação da tolerância ao frio foi feita através do recrescimento do coleóptilo, em mm, que consistiu na diferença entre a segunda e a primeira medições.

No estágio vegetativo plantas com seis folhas foram submetidas à 15°C por 12 dias em sala climatizada com fotoperíodo de 12 horas. Após os doze dias de frio as plantas foram avaliadas quanto à estatura e grau de amarelecimento (data 1). A partir daí a temperatura da sala foi programada para 28°C por um período de sete dias, após o qual foi feita nova avaliação da estatura e do amarelecimento das plantas (data 2). Nestas mesmas datas foram também avaliadas a estatura e o amarelecimento de plantas mantidas na casa-de-vegetação como controle. A estatura foi avaliada medindo-se a distância da base da planta até a ponta da folha mais longa, em cm. O grau de amarelecimento foi avaliado por meio de leituras com aparelho clorofilômetro, as quais foram realizadas na base, meio e ápice da 4^a, 5^a e 6^a folhas de cada planta. A tolerância ao frio no estágio vegetativo foi obtida pela comparação das avaliações realizadas na situação de frio com o controle e expressa como

a porcentagem de redução na clorofila e na estatura das plantas nas datas 1 e 2 (REDCLOD1, REDCLOD2, REDESTD1 e REDESTD2).

No período reprodutivo plantas nos estádios de microsporogênese e antese foram submetidas à temperatura de 17°C por sete dias. Em cada genótipo, algumas plantas foram mantidas permanentemente na casa-de-vegetação, como controle. Na maturação as panículas foram colhidas individualmente e posteriormente avaliadas quanto à exerceção, porcentagem de fertilidade de espiguetas e peso de 100 grãos. A tolerância dos genótipos ao frio no período reprodutivo foi avaliada através da porcentagem de redução nestas três características pelo frio na microsporogênese e antese (REDEXERM, REDFERTM, REDPGRAOM, REDEXERA, REDFERTA e REDPGRAOA).

Os dados relativos às características de tolerância ao frio foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$). A partir dos dados médios dos seis genótipos para as doze características avaliadas foi realizada uma análise de agrupamento no Programa NT-SYS, através da qual foi construído um dendrograma, mostrando a proximidade relativa entre os genótipos quanto à reação ao frio.

A verificação de polimorfismos ao nível de DNA foi feita pela técnica de RAPD utilizando o seguinte protocolo: tampão 1X, MgCl₂ [2,5mM], dNTPmix [0,2mM], 25ng de primer, 1U de Taq polimerase e 20 ng de DNA genômico em 13µl de volume final completado com água milliQ estéril. A amplificação do DNA foi feita em termociclador MJ Research utilizando o seguinte programa: 94°C por 4', seguido de 45 ciclos de 94°C por 30" (desnaturação), 37°C por 30" (anelamento) e 72°C por 66" (extensão) e um estágio final de 72°C por 7'. Foram testados 99 primers da OPERON, porém os resultados foram baseados em apenas 74 primers que forneceram 161 bandas polimórficas e com intensidade confiável para análise. Para a análise de agrupamento os resultados das análises de RAPD foram computados como 1 (presença de banda) e 0 (ausência de banda), constituindo uma matriz de dados relativa aos seis genótipos e 161 marcadores. A similaridade dos genótipos foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de Jaccard no Programa NT-SYS e construído o dendrograma.

Os seis genótipos de arroz diferiram significativamente entre si para as doze características estudadas (Tabela 1), indicando a existência de variabilidade para tolerância ao frio nos três estádios de desenvolvimento. Cabe salientar que quanto maior o recrescimento do coleóptilo e menor a redução nas outras características avaliadas, maior é a tolerância ao frio do genótipo. Pelos resultados obtidos foi possível verificar que os genótipos Quilla 64117, Quilla 66304 e Diamante apresentam maior tolerância ao frio nos três estádios de desenvolvimento que os genótipos Irga 417, Embrapa 7 – Taim e IR 8.

Tabela 1. Médias das 12 características utilizadas para a avaliação da tolerância ao frio de seis genótipos de arroz em três estádios de desenvolvimento.

Genótipo	Germinação		Estádio vegetativo			
	Redcol	Recresc	Redclod1	Redclod2	Redestd1	Redestd2
E-Taim	38 a	9 b	36 a	38 b	14 ab	13 ab
Irga 417	32 a	10 b	31 a	55 a	11 ab	4 b
IR 8	43 a	15 b	29 a	37 b	10 ab	8 b
Diamante	11 b	28 a	16 b	20 c	22 a	22 a
Quilla 66304	31 a	28 a	13 b	8 c	2 b	7 b
Quilla 64117	15 b	26 a	7 b	9 c	3 b	3 b
Genótipo	Estádio reprodutivo					
	Redexera	Redferta	Redpga	Redexerm	Redfertm	Redpgm
E-Taim	243 b	99 a	88 a	12 b	95 a	84 a
Irga 417	125 d	99 a	88 a	14 b	67 c	58 c
IR 8	649 a	87 b	77 a	443 a	82 b	73 b
Diamante	162 c	46 c	47 b	11 b	6 d	14 e
Quilla 66304	139 cd	52 c	57 b	9 b	2 d	7 e
Quilla 64117	1 e	11 d	26 c	50 b	14 d	30 d

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

Pela análise de agrupamento, feita com base nos dados moleculares, a similaridade entre os genótipos tolerantes e sensíveis estudados foi mínima (Figura 1), indicando que qualquer cruzamento Indica x Japônica pode ser utilizado para o desenvolvimento da população a ser mapeada. Isto demonstra o alto grau de polimorfismo existente entre os genótipos indica e Japônica estudados com base em marcadores RAPD.

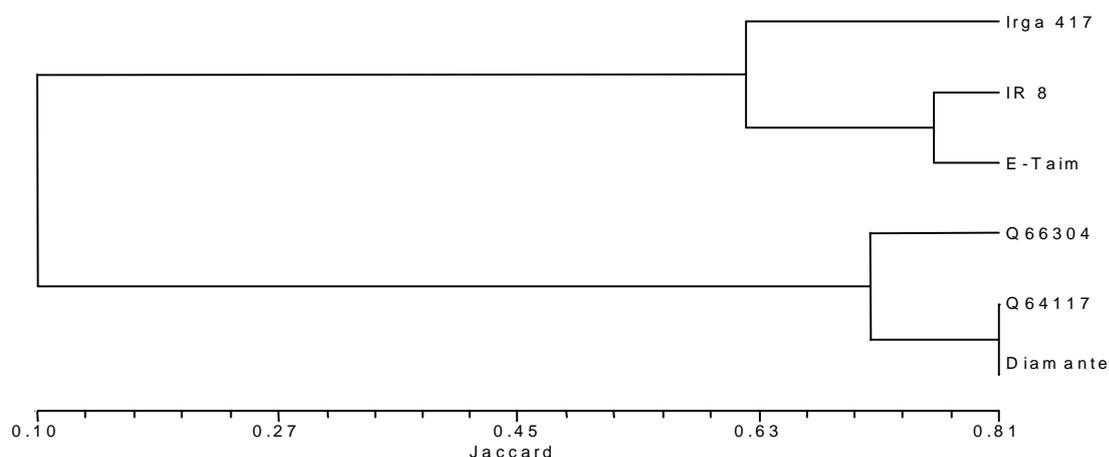


Figura 1 - Dendrograma de seis genótipos de arroz baseado no índice de Jaccard obtido a partir de 161 marcadores RAPD.

Já no agrupamento dos genótipos feito com base nos dados fenotípicos (Figura 2) não foi observada uma diferenciação tão clara entre os genótipos Indica e Japônica como aquela obtida pelo agrupamento molecular (Figura 1). A exceção foi o genótipo Japônica Quilla 64117, que divergiu em relação aos demais, sendo indicado como genitor tolerante da população de mapeamento.

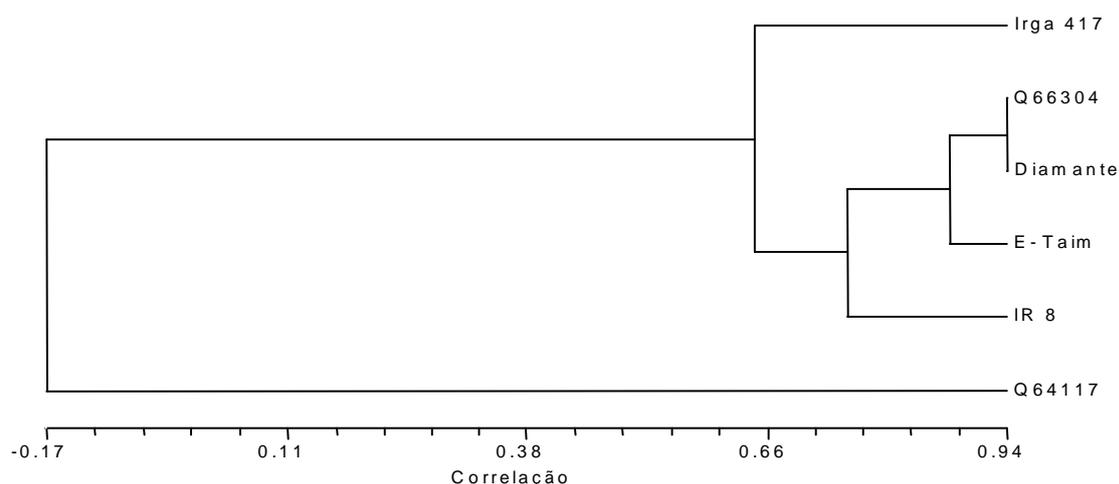


Figura 2 - Dendrograma de seis genótipos de arroz baseado na correlação obtida a partir de 12 características de tolerância ao frio. UFRGS, 2001.

Assim, apesar dos dados moleculares indicarem que qualquer população Indica x Japônica pode ser utilizada no mapeamento devido ao alto polimorfismo existente entre as subespécies, a população mais indicada para o mapeamento da tolerância ao frio é a que envolve o genótipo tolerante Quilla 64117 e um dos sensíveis Irga 417 ou Embrapa 7 - Taim, pela elevada divergência com base nas características moleculares e fenotípicas.

Apoio financeiro: FLAR.