

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
SEMENTES**



Tese

**AVALIAÇÃO DE CRUZAMENTOS DE ARROZ TOLERANTES/SENSÍVEIS À
BAIXA TEMPERATURA NO ESTÁDIO DE GERMINAÇÃO E ESTUDO DO
TRANSCRIPTOMA**

PABLO RICARDO BELARMINO CADORE

Pelotas, 2015.

Pablo Ricardo Belarmino Cadore

**AVALIAÇÃO DE CRUZAMENTOS DE ARROZ TOLERANTES/SENSÍVEIS À
BAIXA TEMPERATURA NO ESTÁDIO DE GERMINAÇÃO E ESTUDO DO
TRANSCRIPTOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Sementes.

Orientador: Luciano Carlos da Maia
Coorientador: Paulo Ricardo Reis Fagundes

Pelotas, 2015.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C111a Cadore, Pablo Ricardo Belarmino

Avaliação de cruzamentos de arroz tolerantes/sensíveis à baixa temperatura no estágio de germinação e estudo do transcriptoma / Pablo Ricardo Belarmino Cadore ; Luciano Carlos da Maia, Paulo Ricardo Reis Fagundes, orientadores. — Pelotas, 2015.

89 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Oryza sativa L. 2. Tolerância ao frio. 3. Metodologia. 4. Genótipo. 5. Rnaseq. I. Maia, Luciano Carlos da, orient. II. Fagundes, Paulo Ricardo Reis, orient. III. Título.

CDD : 633.15

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Pablo Ricardo Belarmino Cadore

**AVALIAÇÃO DE CRUZAMENTOS DE ARROZ TOLERANTES/SENSÍVEIS À
BAIXA TEMPERATURA NO ESTÁDIO DE GERMINAÇÃO E ESTUDO DO
TRANSCRIPTOMA**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Sementes do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:

29/09/2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luciano Carlos da Maia (Orientador), Doutor em Agronomia, Fitomelhoramento na Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Paulo Ricardo Reis Fagundes (Coorientador), Doutor em Fitotecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dr. Silmar Teichert Peske, Doutor em Agronomia, Tecnologia de Sementes na Mississippi State University.

Dr. Geri Eduardo Meneguello, Doutor em Ciência e Tecnologia de Sementes na Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Daniel da Rosa Farias, Doutor em Agronomia, Fitomelhoramento na Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho à minha família, meus pais Valtamir e Cledi, meu irmão Robson e a minha esposa Michele pessoas que amo e admiro.

Agradecimentos

A Deus por tudo.

Ao professor Luciano Carlos da Maia, pela orientação e em especial pela compreensão e confiança.

Ao professor Silmar Teichert Peske, em especial pela confiança e oportunidade.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes pela realização do curso.

Aos professores do curso, pela oportunidade e ensinamentos adquiridos.

A Capes pela bolsa de estudos.

A minha esposa Michele pela compreensão, carinho, apoio e ajuda em todos os momentos.

Aos meus pais pelo amor, incentivo e ensinamentos durante toda a vida.

Aos amigos e colegas do Curso de Pós-Graduação Guilherme Fiss, Verônica Schinagl, Lucas Marcolin, Taiane Viana e Railson dos Santos pela amizade, companheirismo e ajuda na condução do trabalho.

Aos amigos que me acompanham e estiveram ao meu lado incentivando e apoiando nesta caminhada.

A todas as pessoas que em algum momento cruzaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma em minha formação.

Resumo

CADORE, Pablo Ricardo Belarmino. **Avaliação de cruzamentos de arroz tolerantes/sensíveis à baixa temperatura no estágio de germinação e estudo do transcriptoma**. 2015. 90f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2015.

O arroz é uma cultura de origem tropical amplamente cultivada em uma diversidade de áreas, atualmente é o segundo cereal mais produzido no mundo. A ocorrência de baixas temperaturas é um estresse comum na cultura do arroz em regiões temperadas, portanto a tolerância a baixas temperaturas é uma característica desejável em genótipos brasileiros de arroz cultivados no sul do país, onde as temperaturas baixas prejudicam a germinação, o estabelecimento da lavoura e diminuem o rendimento de grãos. Portanto, este trabalho tem como objetivo estudar o comportamento de cruzamentos de arroz tolerantes e sensíveis para o caráter de tolerância ao frio no estágio de germinação e identificar genes diferencialmente expressos através do transcriptoma. Foram realizados cruzamentos controlados com 5 genitores contrastantes. Os genitores e as populações segregantes em F3 e F4 foram submetidos a tratamentos com diferentes temperaturas (13°C e 25°C) e comparados quanto ao seu desempenho relativo, medido pela germinação, índice de velocidade de germinação em laboratório e em campo, comprimento do coleóptilo e comprimento da raiz. A análise do transcriptoma foi realizada através do RNAseq de dois genótipos BRS SCS Tio Taka e Oro, submetidos a tratamentos com diferentes temperaturas (13°C e 25°C). Os resultados indicam que o índice de velocidade de germinação obtido em laboratório, apresenta maior eficiência em identificar genótipos e populações comparado com a avaliação em campo. O comprimento do coleóptilo e o índice de velocidade de germinação são as metodologias mais adequadas pela elevada associação com a germinação em baixas temperaturas. Os resultados das correlações na geração F3 diferem dos resultados apresentados na geração F4, devido a segregação das populações. Na cultivar tolerante Oro, poucos genes tiveram expressão gênica aumentada significativamente. Uma lista de 55 genes com diferença na expressão comuns as duas cultivares e uma lista com 17 genes com diferença na expressão únicos para a cultivar tolerante Oro, foram selecionados devido a respostas desses genes à tolerância ao frio na germinação de arroz.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L.; tolerância ao frio; metodologia; genótipo; RNAseq.

Abstract

CADORE, Pablo Ricardo Belarmino. **Evaluation of rice crossings tolerant/sensitive to low temperature in the germination stage and study the transcriptome.** 2015. 90f. Thesis (Doctor in Seed Science and Technology) – Pos-graduate Program in Seed Science and Technology, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas. Pelotas, 2015.

Rice is a tropical crop widely grown in a variety of areas, is currently the second most-produced cereal in the world. The presence of low temperatures is a common stress in rice crops in temperate regions, so the tolerance to low temperatures is a desirable characteristic in Brazilian rice genotypes cultivated in the south, where low temperatures damage germination, establishment of the crop and decrease grain yield. Therefore, this paper aims to study the behavior of rice crossings tolerant and sensitive to cold tolerance at the germination stage and identify differentially expressed genes through the transcriptome. Controlled crosses with 5 contrasting genotypes were performed. The parents and segregating populations in F3 and F4 were subjected to treatments with different temperatures (13°C e 25°C) and compared for their relative performance, as measured by germination, germination speed index in the laboratory and in the field, length coleoptile length and root. The transcriptome analysis was performed through the RNAseq two genotypes BRS SCS Tio Taka and Oro, submitted to treatment with different temperatures (13°C e 25°C). The results show that the germination speed index obtained in the laboratory, has higher efficiency and populations to identify genotypes compared with the field evaluation. The length of the coleoptile and the germination speed index are the most appropriate methodologies due the high association with germination at low temperatures. The results of the correlations in the generation F3 differed from the results shown in the F4 generation due to segregation populations. In tolerant cultivar Oro, few genes have increased gene expression significantly. A list of 55 genes with common expression difference in the two cultivars and a list of 17 genes with only difference in the expression for the tolerant cultivar Oro, were selected due to responses of these genes to cold tolerance in rice germination.

Key - words: *Oryza sativa* L.; cold tolerance; methodology; genotype; RNAseq.

Lista de Figuras

5. CAPÍTULO III. Expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao frio no estágio de germinação do arroz	67
Figura 1. PlotMDS, indicando a dispersão dos tratamentos e repetições, em função do padrão geral de expressão gênica de cada amostra.	71
Figura 2. <i>HeatMap</i> , distância entre as amostras em função de seus padrões gerais de expressão gênica.....	72
Figura 3. Distribuição normal dos dados de expressão gênica nos diferentes tratamentos. A) Cultivar tolerante Oro; B) Cultivar sensível Tio Taka.	72
Figura 4. Regressão linear entre valores de expressão (FPKM) na condição de estresse por frio vs. Controle: A) Cultivar tolerante Oro, regressão entre todos os genes; B) Cultivar tolerante Oro, regressão entre genes com expressão diferencial significativa; C) Cultivar sensível Tio Taka, regressão entre todos os genes; D) Cultivar sensível Tio Taka, regressão entre genes com expressão diferencial significativa.	74
Figura 5. Distribuição dos valores de mudança na expressão (Log2FC) vs. contagem no número de leitura (<i>counts per million</i>). Pontos em cinza são genes com expressão diferencial não significativa e vermelha com expressão diferencial significativa. A) Cultivar tolerante Oro e B) Cultivar sensível Tio Taka.	75
Figura 6. Gráfico da “Visão geral do metabolismo” gerada pelo programa <i>MapMan</i> . Azul significa pontos do metabolismo com aumento na expressão e vermelho redução na expressão. A) Cultivar tolerante Oro e B) Cultivar sensível Tio Taka.	76
Figura 7. Gráfico das funções celulares gerada pelo programa <i>MapMan</i> . Azul significa pontos do metabolismo com aumento na expressão e vermelho redução na expressão. A) Cultivar tolerante Oro e B) Cultivar sensível Tio Taka.....	78
Figura 8. Gráfico dos genes/proteínas conhecidas como associadas a estresse abiótico, gerada pelo programa <i>MapMan</i> . Azul significa pontos do metabolismo com aumento na expressão e vermelho redução na expressão. A) Cultivar tolerante Oro e B) Cultivar sensível Tio Taka.....	79
Figura 9. Diagrama de Venn. Em azul genes diferencialmente expressos (únicos) no genótipo Oro, em amarelo genes diferencialmente expressos (únicos) em Tio taka e cinza genes diferencialmente expressos comuns aos dois genótipos...	80
Figura 10. Valores de expressão (FPKM) dos 149 genes diferencialmente expressos presentes na cultivar tolerante Oro.	81

Figura 11. Seleção de genes com maior diferença de expressão (controle/frio) entre os 149 genes únicos da cultivar tolerante Oro.	81
Figura 12. Genes diferencialmente expressos (controle/frio) nas cultivares Tio Taka-sensível (preto) e Oro-tolerante (vermelho). Dados ordenados pelos valores Log2FC da cultivar Oro.....	83
Figura 13. Seleção das maiores diferenças de expressão (controle/frio) entre os 235 genes diferencialmente expressos em comum nas cultivares Tio Taka e Oro.	84

Lista de Tabelas

3. CAPÍTULO I. Caracterização de populações segregantes quanto à tolerância ao frio no estágio de germinação de arroz	34
Tabela 1. Nome dos genótipos, grupo e resposta ao frio na germinação e emergência.....	38
Tabela 2. Descrição dos cruzamentos realizados e nomenclatura.	39
Tabela 3. Quadrado médio e coeficiente de variação (CV) para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nos genitores. Pelotas, 2015.....	42
Tabela 4. Comparação de médias pelo teste de Tukey para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nos genitores. Pelotas, 2015.....	43
Tabela 5. Coeficiente de correlação simples para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nos genitores sensíveis. Pelotas, 2015.....	44
Tabela 6. Coeficiente de correlação simples para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nos genitores tolerantes. Pelotas, 2015.	45
Tabela 7. Coeficiente de correlação simples para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nas populações segregantes. Pelotas, 2015.	45
Tabela 8. Quadrado médio e coeficiente de variação (CV) para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) para as populações segregantes em geração F3 e F4. Pelotas, 2015.	46
Tabela 9. Comparação de médias pelo teste Duncan para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) para as populações segregantes em geração F3 e F4. Pelotas, 2015.	47
4. CAPÍTULO II. Metodologia de avaliação de genótipos tolerantes à baixas temperaturas na germinação de arroz	52
Tabela 1. Nome dos genótipos, grupo e resposta ao frio na germinação e emergência.....	55
Tabela 2. Descrição dos cruzamentos realizados e nomenclatura.	56
Tabela 3. Quadrado médio e coeficiente de variação (CV) para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores. Pelotas, 2015.	59

Tabela 4. Quadrado médio e coeficiente de variação (CV) para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) para as populações segregantes em geração F3 e F4. Pelotas, 2015.	60
Tabela 5. Coeficiente de correlação o simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores sensíveis no ano de 2012. Pelotas, 2015.	60
Tabela 6. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores sensíveis no ano de 2013. Pelotas, 2015.	61
Tabela 7. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores tolerantes no ano de 2012. Pelotas, 2015.	61
Tabela 8. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores tolerantes no ano de 2013. Pelotas, 2015.	62
Tabela 9. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nas populações sensíveis em F3. Pelotas, 2015.	62
Tabela 10. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nas populações sensíveis em F4. Pelotas, 2015.	63
Tabela 11. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nas populações tolerantes em F3. Pelotas, 2015.	63
Tabela 12. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nas populações tolerantes em F4. Pelotas, 2015.	64
5. CAPÍTULO III. Expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao frio no estágio de germinação de arroz	67
Tabela 1. Lista de genes diferencialmente expressos, selecionados na cultivar tolerante Oro.	82

Tabela 2. Lista de genes diferencialmente expressos (seleção 1), genes *dow-regulated* na cultivar sensível Tio Taka e *up-regulated* na cultivar tolerante Oro. 84

Tabela 3. Lista de genes diferencialmente expressos (seleção 2), genes com aumento de expressão nas cultivares Tio Taka e Oro, mas com maior expressão na cultivar sensível Tio Taka. 85

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Revisão da Literatura.....	18
2.1 Origem e classificação botânica do arroz	18
2.2 Efeitos das baixas temperaturas	19
2.3 Problemas do frio na cultura do arroz no Rio Grande do Sul	22
2.4 Melhoramento para tolerância ao frio em arroz.....	23
2.5 Genética da tolerância ao frio	25
2.6 Transcriptoma	28
2.7 Referências bibliográficas	29
3. CAPÍTULO I. Caracterização de populações segregantes quanto à tolerância ao frio no estágio de germinação de arroz.....	34
3.1 Introdução	34
3.2 Material e Métodos.....	37
3.3 Resultados e discussão	42
3.4 Conclusão	48
3.5 Referências bibliográficas	49
4. CAPÍTULO II. Metodologia de avaliação de genótipos tolerantes à baixas temperaturas na germinação de arroz	52
4.1 Introdução	52
4.2 Material e Métodos.....	54
4.3 Resultados e discussão	59
4.4 Conclusão	64
4.5 Referências bibliográficas	65
5. CAPÍTULO III. Expressão diferencial de genes relacionados à tolerância ao frio no estágio de germinação de arroz	67
5.1 Introdução	67
5.2 Material e Métodos.....	68
5.3 Resultados e discussão	70
5.4 Conclusão	87
5.5 Referências Bibliográficas.....	87
6. Considerações finais	89

1. Introdução

O arroz é uma cultura de origem tropical, amplamente cultivada em uma diversidade de áreas, atualmente é o segundo cereal mais produzido no mundo. É considerado pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) o cereal cultivado mais importante para a segurança alimentar, sendo o principal componente nutricional para mais da metade da população mundial, especialmente na Ásia onde é a base alimentar, chegando a fornecer de 60 a 70% do total de calorias consumidas pela população (FAO, 2013).

O Brasil é um dos dez maiores produtores mundiais de arroz e o maior da América do Sul, cultivando aproximadamente 2,2 milhões de hectares, sendo a terceira maior cultura agrícola em área cultivada no país, depois do milho e da soja. O estado do Rio Grande do Sul (RS) é o principal produtor de arroz irrigado, apresentando uma área de cultivo estimada em 1,12 milhão de hectares, correspondendo a 70% da produção nacional (CONAB, 2015).

O potencial de rendimento da cultura do arroz está relacionado a uma série de fatores adversos e complexos. Entre os fatores que podem influenciar o rendimento de grãos do arroz, destaca-se a sensibilidade a temperaturas baixas durante os diferentes períodos de desenvolvimento da cultura. A faixa de temperatura ótima para a cultura se encontra entre 25°C e 30°C, e temperaturas inferiores a 20°C, dependendo do estágio de desenvolvimento, são prejudiciais, sendo comuns em áreas temperadas e subtropicais ou nas regiões de altitude elevada (YOSHIDA, 1981; CRUZ; MILLACH, 2000).

O arroz é cultivado, de forma geral, nos meses de outubro a abril e, em algumas regiões produtoras do Rio Grande do Sul, a temperatura mínima média mensal no mês de outubro, quando a cultura está sendo implantada, é de 12°C e nos meses de janeiro e fevereiro atinge 18°C, sendo que a mínima absoluta registrada nesta região chega a 7,4°C em janeiro (OLIVEIRA, 1997).

No Rio Grande do Sul, a semeadura do arroz pode ocorrer em condições ambientais adversas como baixas temperaturas do ar e do solo, entretanto a semeadura antecipada é necessária para escapar da baixa temperatura do ar que ocorre no mês de janeiro na fase reprodutiva, fase mais crítica para a cultura. A ocorrência de baixas temperaturas nas fases vegetativas iniciais de desenvolvimento da cultura pode causar danos no estabelecimento e *stand* inicial da lavoura e, mais tardiamente no período reprodutivo, pode provocar perdas no rendimento de grãos devido à esterilidade de espiguetas (TERRES; GALLI, 1985).

As baixas temperaturas afetam o comportamento agrônomo do arroz dependendo da cultivar, da intensidade e da duração do frio. Além da necessidade de elevar a densidade de sementes por área, alongam o período de emergência das plântulas, prejudicando o estabelecimento da lavoura. O fato também dificulta o manejo da água, atrasando o início da irrigação e ocasionando maturação desuniforme, diminuindo o rendimento de grãos e causando perdas pela desuniformidade da umidade na colheita e secagem (TERRES; GALLI, 1985).

A temperatura é um fator de natureza abiótica e imprevisível e, por isso, os efeitos negativos de sua ocorrência sobre o arroz são de difícil controle em nível de manejo, o que torna a tolerância genética das cultivares extremamente importante para estabilizar o rendimento de grãos nas áreas sujeitas à ocorrência de frio (CRUZ; MILLACH, 2000).

A estratégia apropriada para desenvolver novas cultivares tolerantes às baixas temperaturas e com elevado potencial produtivo, é a utilização de cruzamentos entre as subespécies *indica* x *japonica*. Cultivares pertencentes à subespécie *japonica* são provenientes de regiões de clima temperado e são tolerantes ao frio. Por outro lado, as cultivares da subespécie *indica* são provenientes de regiões tropicais e são suscetíveis ao frio (MACKILL; LEI, 1997).

No Brasil por questões culturais as cultivares mais aceitas são da subespécie *indica*, devido a qualidade dos grãos, isto é, estas variedades produzem grão tipo longo e vítreo que após o cozimento ficam “soltos”, enquanto, as variedades do tipo *japonica* produzem grãos não vítreos e curtos.

A seleção de genitores e a caracterização da variabilidade genética existente são importantes em programas de melhoramento, pois uma das principais necessidades é a identificação de plantas que possuam genes e/ou alelos responsáveis por determinada característica de interesse.

O melhoramento genético para a tolerância ao frio apresenta dificuldades relacionadas ao tipo de herança do caráter, que é de natureza quantitativa e altamente influenciada pelo ambiente e, cuja seleção a campo tem baixa precisão pela instabilidade e imprevisibilidade da ocorrência do estresse no momento da seleção.

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 utilização de marcadores moleculares permite que os melhoristas estudem com maior precisão e confiabilidade o caráter desejado, pois a variabilidade é acessada e selecionada em nível de DNA, permitindo assim a análise direta do genoma, sem a interferência do ambiente. Através deles é possível analisar cada genótipo de interesse, possibilitando assim a obtenção de informações relativas à variabilidade existente, identificação de genótipos, genes e/ou alelos específicos associados a características fenotípicas de interesse agrônomo.

Este trabalho tem por objetivo geral estudar o comportamento de populações segregantes de arroz tolerantes e sensíveis para o caráter de tolerância ao frio no estágio de germinação e identificar genes diferencialmente expressos através do transcriptoma.

2. Revisão da Literatura

2.1 Origem e classificação botânica do arroz

O arroz é uma monocotiledônea da família *Poaceae* (*Gramineae*), subfamília *Pooideae*, tribo *Oryzae* e gênero *Oryza*. É uma planta anual ou perene, que pode se desenvolver em condições de solo alagado ou seco (MAGALHÃES JUNIOR; OLIVEIRA, 2008). A adaptação às condições aquáticas ou de inundação parece ter sido o principal fator na evolução de *Oryzae*, uma tribo isolada de gramíneas com cerca de quatorze gêneros (CHANDRARATNA, 1964).

As principais características morfológicas do gênero *Oryza* são a presença de glumas estéreis rudimentares, espiguetas bissexuais e folhas estreitas, herbáceas com nervuras lineares e bordos serrilhados (VAUGHAN et al., 2003). Botanicamente, esse gênero se caracteriza por apresentar espiguetas conectadas à ráquila e por conter uma única flor terminal fértil, composta de duas glumelas florais (pálea e lema), seis estames, um estigma bifido, e duas glumelas estéreis localizadas na base da flor (PEREIRA, 2002).

O gênero *Oryza* é considerado o mais importante da tribo e compreende aproximadamente 23 espécies que estão distribuídas pelas regiões da Ásia, África, América do Sul e América Central (MAGALHÃES JUNIOR; OLIVEIRA, 2008). Dentre essas espécies destacam-se as duas que são cultivadas, *Oryza sativa* L. (arroz asiático) e *Oryza glaberrima* Steud (arroz africano), as quais pertencem a um grupo de espécies chamado complexo *Oryza sativa*, junto com cinco espécies silvestres, *O. rufipogon*, *O. longistaminata*, *O. barthii*, *O. glumaepatulae* e *O. meridionalis*. Este complexo foi primeiramente definido como espécies diplóides tendo o genoma A em comum. *O. sativa*, *O. glaberrima* e seus aparentados silvestres são diplóides ($2n=2x=24$), constituídos pelo genoma AA, enquanto sete espécies silvestres são tetraplóides ($4n=2x=48$) (CHANG, 1996).

O centro de origem da espécie *O. sativa* é a Ásia e acredita-se a sua domesticação tenha ocorrido aproximadamente entre 10.000 e 9.000 anos (KAWAKAMI et al., 2007). O país onde foi domesticada essa espécie é desconhecido, embora existam fortes evidências de que seu centro de origem seja o sudeste asiático, mais precisamente na região compreendida entre a Índia e Mianmar, em virtude da rica diversidade de formas cultivadas desse arroz ali encontradas (PEREIRA, 2002).

A espécie selvagem *Oryza rufipogon* é o ancestral mais provável de *Oryza sativa* (CHANG, 1996). Com o processo evolutivo e a domesticação a que foi submetido *O. sativa* ao longo dos tempos, foram surgindo inúmeros tipos geneticamente divergentes, os quais foram se adaptando às mais variadas condições agroecológicas no mundo. Assim sendo, com base na distribuição geográfica, na morfologia da planta e do grão, na esterilidade dos cruzamentos, e em outras características, essa espécie foi classificada em duas principais subespécies, grupos ou variedades eco geográficas, denominadas *indica* e *japonica* (LU; CHANG, 1980).

As cultivares da subespécie *indica* são predominantemente cultivados nos trópicos e subtropicais e os da subespécie *japonica* em regiões temperadas. Essas subespécies diferem em vários caracteres como: tolerância às baixas temperaturas, tolerância à seca, tolerância ao acamamento, resposta a adubação em variedades não melhoradas, habilidade para competir, temperatura mínima para germinar, taxa de crescimento, longevidade da semente e eficiência em folhas com mesmo conteúdo de proteínas (MATSUO, 1997).

2.2 Efeitos das baixas temperaturas

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 regiões 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, 1981).

Na ampla faixa geográfica onde o arroz é cultivado, temperaturas baixas são comuns em um ou mais estádios de desenvolvimento. Os danos mais comuns em decorrência do frio são: falhas na germinação, atraso na emergência de plântulas, redução na estatura de planta, descoloração de folhas, degeneração da ponta da panícula, exerceção incompleta da panícula, atraso na floração, alta esterilidade de espiguetas e maturação irregular de grãos (YOSHIDA, 1981).

A germinação e o rápido desenvolvimento das plântulas são fases críticas na transição de uma semente para uma planta autotrófica. A semente sem absorver umidade é altamente tolerante a baixas temperaturas, mas este estado é revertido com o início da germinação. Uma vez reativado o metabolismo inicia-se o processo de crescimento e desenvolvimento da plântula, e a semente torna-se muito sensível a condições de estresse como baixa temperatura ou baixa umidade (DE LOSREYES et al., 2003).

No processo de germinação, a severidade dos danos causados por baixas temperaturas depende de fatores como: cultivar utilizada, conteúdo inicial de água na semente, temperatura de exposição, duração do estresse e a fase do processo de germinação (BEDI; BASRA, 1993).

Os maiores efeitos da baixa temperatura durante a germinação parecem ser associados à fase de embebição, considerada a mais sensível (BLUM, 1988). Em cultivares muito sensíveis, o frio causa danos irreversíveis aos componentes da célula e ao metabolismo, a membrana celular é o alvo primário. A baixa temperatura durante esta fase conduz ao escape crescente de solutos das células das sementes. Em decorrência das dificuldades de reestruturação, impostas pela baixa temperatura durante a germinação, a membrana celular é causadora de outros distúrbios metabólicos (LYONS, 1973). Como consequência do metabolismo anormal, as células danificam-se e acumulam compostos tóxicos e radicais livres de oxigênio que causam em caso extremo, a morte de células (MORSY et al., 2005). Os sintomas de dano por baixas temperaturas mais comumente observadas, na fase germinativa, são o atraso e a diminuição na porcentagem de germinação, afetando consideravelmente o estande de plantas e a produtividade final da lavoura.

Os estádios mais críticos quanto a ocorrência de baixas temperaturas 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, 1981).

Em plantas de arroz, a taxa de crescimento e o metabolismo são inibidos por temperaturas entre 15 e 20°C, porém, o mecanismo fisiológico do estresse por baixas temperaturas e as mudanças metabólicas não estão claros. Reconhece-se que os padrões da síntese de proteínas e os níveis de mRNA mudam quando as plantas são expostas às baixas temperaturas. No estágio inicial, a fosforilação de proteínas celulares ou ativação de kinases tem sido detectada (KOMATSU, 1999). Outras mudanças como a síntese de novas proteínas, alterações na saturação dos lipídeos e clorose nas folhas novas pela falta de clorofila, têm sido reportadas (KAZEMITABAR et al., 2003). A perda da integridade da membrana celular, como consequência da resposta física dos lipídeos ao frio, é o componente crítico, e a capacidade de síntese de ácidos graxos insaturados ou um maior conteúdo destes, seria fundamental na resistência (BEDI; BARSA, 1993).

Em países como Austrália, China, Japão, Coreia, 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, 1981). 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 dano observado, tornando o melhoramento para a tolerância ao frio em arroz extremamente dependente das condições locais. 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 (CRUZ; MILACH, 2000).

2.3 Problemas do frio na cultura do arroz no Rio Grande do Sul

No Rio Grande do Sul 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 estande de plantas daninhas (CRUZ; MILACH, 2000). 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, 1981). Como consequência observa-se efeitos diretos no rendimento de grãos devido ao aumento da esterilidade das espiguetas.

As sementes de cada espécie apresentam temperatura mínima, máxima e ótima de germinação (NEDEL, 2003). O arroz para germinar apresenta temperatura mínima do ar de 10°C (POPINIGIS, 1985) e para boa emergência, a temperatura do solo deve ser igual ou superior a 20°C (STEINMETZ et al., 2001; NEDEL, 2003), sendo que sementes de alta qualidade apresentam maior amplitude de temperatura de germinação.

A semeadura em período de baixas temperaturas é realizada para que o período reprodutivo do arroz não ocorra em condições de temperatura do ar inferior a 15°C, que podem ocasionar decréscimo no rendimento de grãos. A ocorrência de frio durante o período reprodutivo do arroz acarreta sempre maior prejuízo à cultura em relação ao período vegetativo (TERRES; GALLI, 1985), que no estado do Rio Grande do Sul pode ser de 25%, chegando em algumas lavouras no sul do Estado a 50% (GOMES et al., 2004).

Para obter altas produtividades é necessário que o período reprodutivo coincida com a fase de maior radiação solar total, temperatura do ar mais elevada e menor umidade relativa, fatores que convergem para o fim do mês de dezembro e início de janeiro (TERRES; GALLI, 1985).

A temperatura do solo na segunda quinzena de setembro e na primeira quinzena de outubro é adversa para a semeadura do arroz, nas regiões da Campanha e Litoral Sul (STEINMETZ et al., 2001), além da ocorrência frequente de chuvas, que também faz baixar a temperatura do solo, dificultando a semeadura, a germinação, a velocidade de emergência, a uniformidade do estande, dificultando o estabelecimento da cultura do arroz (ZIMMER, 2006). A escolha da época de semeadura é uma importante prática na obtenção de altos e estáveis níveis de produtividade, pelo fato de aumentar as chances em que as fases críticas da planta escapem dos períodos climáticos adversos ao seu desenvolvimento (STEINMETZ et al., 2001).

A maioria das cultivares de arroz irrigado tem origem comum e procede de cruzamentos entre genitores com constituição genética semelhante. Essa situação torna o cultivo do arroz potencialmente vulnerável a estresses bióticos e abióticos, colocando em risco a estabilidade da produção. A tolerância a baixas temperaturas é uma característica desejável em genótipos de arroz cultivados no sul do Brasil. Porém, é uma das características de difícil seleção a campo, pois não se sabe a época em que vai ocorrer o estresse e nem a duração, limitando o progresso ao nível de melhoramento. Vários procedimentos de avaliação estão sendo utilizados para selecionar genótipos tolerantes a ocorrência de baixas temperaturas em períodos específicos de desenvolvimento da planta (CRUZ; MILACH, 2000).

2.4 Melhoramento para tolerância ao frio em arroz

As plantas de arroz se diferenciam com relação à resposta às temperaturas, devido à adaptação as diferentes regiões, a subespécie *japonica* se adaptou em áreas de clima temperado, e a subespécie *indica* às condições de clima tropical. Assim as diferenças fenotípicas no que se refere à tolerância ao frio na fase de germinação-emergência estão relacionadas com adaptação a condições específicas de cultivo.

As subespécies *indica* e *japonica* são diferenciadas através de diversos fatores, que abrangem desde aspectos morfológicos até reações a estresses abióticos. As principais diferenças estão relacionadas com a tolerância a baixas

temperaturas, tolerância ao acamamento, habilidade para competir, taxa de crescimento e longevidade da semente. Outras características, como a relação comprimento e largura das sementes são usadas para diferenciar as duas subespécies. As cultivares da subespécie *indica* apresentam grãos mais longos e finos, as da subespécie *japonica* apresentam grãos largos e curtos (MATSUO, 1997). No Brasil, a preferência se dá por grãos do tipo *indica*.

Jones e Peterson (1976) reportaram que cultivares *japonicas* apresentaram um maior índice de emergência em condições de baixas temperaturas (15°C) sendo mais tolerantes ao frio na germinação, do que as cultivares *indica*. Redoña e Mackill (1996) realizaram um extensivo estudo sobre a variação genética do vigor de plântula e reportaram que as variedades *japonicas* temperadas e as *japonicas* tropicais foram mais vigorosas do que as *indicas*. Por outro lado, Mackill e Lei (1997), estudaram 117 cultivares previamente classificadas como *indica*, *japonica* e *javanica* (*japonica* tropical) em câmaras de crescimento utilizando solo e no campo, concluíram que as *japonica* e *javanica* são mais tolerantes do que as *indica*.

A tolerância ao frio é uma característica de difícil seleção a campo, uma vez que não se pode ter certeza da ocorrência ao estresse e nem da época e duração do mesmo. Devido à dificuldade de controle da quantidade e da duração do estresse de frio em condições de campo, inúmeros procedimentos de avaliação vêm sendo utilizados no sentido de selecionar genótipos tolerantes ao frio em períodos específicos de desenvolvimento.

Mackill et al. (1996) utilizaram ambiente controlado para selecionar para tolerância ao frio e a semeadura mais tardia coincidir com florescimento das plantas como épocas em que a temperatura do ar estão baixas. Além disso, estes autores recomendaram a avaliação da esterilidade de espiguetas como boa estimativa da tolerância ao frio. No estádio de antese, populações F1, F2 e F3 derivadas do cruzamento entre genótipos tolerantes e sensíveis foram avaliadas em condições de fitotron com temperatura controlada, sendo a tolerância ao frio (20°C) medida pela porcentagem de espiguetas férteis (KHAN et al., 1986).

A seleção na germinação e no período vegetativo é mais fácil por necessitar de espaço físico menor e, assim, permitir avaliação de grande

quantidade de plantas em condições controladas, tanto em germinadores como em fitotrons. Algumas metodologias já foram descritas para esse fim as quais abrangem teste de germinação (BERTIN; BOUHARMONT, 1997; CRUZ; MILACH, 2004; DASHTMIAN et al., 2013), no período vegetativo (ANDAYA; MACKILL, 2003), até testes mais refinados envolvendo avaliação do escape de solutos de células (PAULL, 1981).

Uma cultivar de arroz pode ser tolerante ao frio no período vegetativo e sensível no reprodutivo, ou vice-versa. Isto provavelmente decorre de diferentes genes de tolerância e diferentes mecanismos fisiológicos envolvidos na tolerância ao frio em cada período. No entanto, a falta de correlação entre a tolerância ao frio num período e outro torna o melhoramento para esta característica bastante complicado quando o objetivo incorporar a tolerância em vários períodos do desenvolvimento (DATTA; SIDDIQ, 1983), pois se este for o caso, será necessário realizar seleção em cada um deles separadamente. A existência de correlação entre diferentes períodos quanto a tolerância ao frio seria vantajosa por permitir, inclusive, seleção indireta para a característica, por exemplo, a seleção para tolerância ao frio no período reprodutivo poderia ser feita mais precocemente em plântulas, onde o espaço requerido é menor e, é possível avaliar o maior número de indivíduos simultaneamente.

2.5 Genética da tolerância ao frio

A tolerância ao frio é a capacidade que certos genótipos suportarem a ocorrência de baixas temperaturas, sem redução importante no rendimento de grãos. Manifesta-se principalmente na fase de emergência, quando as plântulas toleram temperaturas de solo ao redor de 13°C e apresentam rápida emergência, bom vigor inicial e folhas de coloração verde normal. No período reprodutivo, quando as plantas toleram temperaturas em torno de 15°C, especialmente nas fases de microsporogênese e floração, sem apresentar esterilidade superior a 15%, má exerceção de panícula e duração maior de sete dias entre o início e o fim da floração. As plantas não devem, ainda, mostrar muita variação na estatura,

tanto com temperaturas baixas como em condições favoráveis de ambiente (TERRES; GALLI, 1985).

A variação quanto à tolerância ao frio observada entre diferentes estádios de desenvolvimento do arroz implica em diferentes genes envolvidos na tolerância em cada estágio. Assim, a genética da tolerância ao frio em arroz tem sido estudada em cada estágio 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. Nesses estudos, a tolerância ao frio é medida de várias formas e é fundamental que se saliente que o tipo de herança encontrado é válido somente para o caráter avaliado, o material genético utilizado e a intensidade e período de frio empregado (CRUZ; MILACH, 2000).

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 nesse período (STHAPIT; WITCOMBE, 1998). Em um estudo de 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 7e IR8), Cruz et al. (2006), concluíram que a porcentagem de redução no comprimento do coleóptilo e 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.

Fujino (2004), desenvolveu uma pesquisa para identificar genes com relação a capacidade de germinação em baixas temperaturas, por meio de retrocruzamentos, foi observada a segregação de um gene simples dominante para a tolerância, denominado *Ltg(t)*.

A herança de tolerância ao frio em arroz no período vegetativo, avaliada através da medição de 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, a qual mostrou herança monogênica, condicionada a apenas um gene recessivo e de herdabilidade moderada (CRUZ et al., 2008)

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.

Recentemente, marcadores moleculares têm sido empregados nos estudos das bases genéticas da tolerância ao frio na fase de germinação-emergência visando a identificação e quantificação dos efeitos de regiões do genoma associadas com caracteres quantitativos. Algumas destas pesquisas serão relatadas a seguir:

Renoña e Mackill (1996), estudaram uma população F₂, de 204 plantas derivadas do cruzamento entre uma cultivar *japonica* (Labelle) e uma *indica* (Black Gora), identificaram 13 “*Quantitative Trait Loci*” (QTL’s) atuando no controle de comprimento de plântula, das raízes e do coleóptilo, relacionados com o vigor de plântula. Esses QTL’s explicaram entre 7% e 38% da variação fenotípica, e tiveram efeitos genéticos de tipo aditivo, dominante e sobredominante.

Miura (2001), utilizaram um cruzamento entre uma cultivar *japonica* (Nipponbare) e uma *indica* (Kasalath), localizaram cinco QTL’s para capacidade de germinação em baixas temperaturas nos cromossomos 2,4,5 e 11.

Fujino et al. (2004) utilizando 122 linhagens endogâmicas derivados de retrocruzamentos (BIL’s) obtidas no cruzamento de Itália Livorno com Hayamassari, identificaram três QTL’s para tolerância ao frio na fase de germinação. Dois QTL’s localizados no cromossomo 3 e outro no cromossomo 4. Um destes denominado de qLTG-3-1, explicou 35% da variação fenotípica.

Zang et al. (2005) utilizaram 282 RIL’s para mapeamento de QTL’s na tolerância ao frio e vigor de semente. Cinco QTL’s foram mapeados no tratamento de 15 °C, destes, somente três mostraram efeitos consistentes nos três regimes de temperatura empregados (15, 20 e 25°C). Os autores concluem que o crescimento das plantas em estresse é em função do vigor da semente e

da tolerância ao frio, e que no arroz existem três tipos de genes relacionados com o vigor de plântula, aqueles relacionados tanto com o vigor quanto com a tolerância, aqueles relacionados unicamente com o vigor e aqueles relacionados somente com a tolerância.

Os diferentes estudos genéticos realizados para a tolerância ao frio na etapa de germinação, permitem estabelecer algumas considerações. Não existe um consenso na literatura acerca de quais seriam as condições de avaliação, dos regimes de temperatura e dos caracteres mais adequados para medir a tolerância às baixas temperaturas nos estádios iniciais da plântula. No que se refere ao controle genético, é aceito que a tolerância é um caráter quantitativo. Em geral têm sido observados efeitos aditivos e de dominância, com poucos relatos da epistasia atuando na tolerância às baixas temperaturas.

Os estudos mais recentes com marcadores moleculares confirmam a existência de um sistema poligênico, porém identificam alguns genes com maior efeito. Nestes estudos, não há concordância no que se refere ao número e a localização dos QTL's, o que deve ser um reflexo do uso de diferentes metodologias para medir a tolerância em diferentes populações e com marcadores distintos. Além disso, os estudos moleculares mostram que na resposta ao frio estão envolvidos vários processos fisiológicos controlados por muitos genes e que se trata de um mecanismo muito complexo.

2.6 Transcriptoma

O transcriptoma pode ser definido como sendo o conjunto completo de transcritos em uma célula, e suas quantidades, em um estágio específico do desenvolvimento ou condição fisiológica, incluem, RNA codificante (mRNA) e não codificante (rRNA, tRNA, RNA estrutural, RNA regulatório, e outros tipos de RNAs) (WANG et al., 2009). Diversos trabalhos já foram realizados com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos no processo de transcrição nas células, uma vez que a alteração nos níveis de expressão está diretamente relacionada a modificações na fisiologia, metabolismo e consequentemente ao processo de adaptação celular (VAN VLIET, 2010).

Para estudar o transcriptoma de um organismo o método que tem sido utilizado atualmente é a nova geração de sequenciamento de DNA, denominada RNA-seq. O mRNA é utilizado para a síntese de cDNA, que é então sequenciado em equipamento de altíssima produtividade. Esta nova tecnologia possui algumas vantagens em relação ao método de microarranjo, que é uma técnica também utilizada para estudar expressão gênica. A principal vantagem de RNA-seq é a capacidade de sequenciar uma grande proporção de transcritos presentes em uma amostra, incluindo os de baixa expressão, e não somente aqueles que são depositados no microarranjo (CHEN et al., 2007). Outra vantagem é a de não necessitar de conhecimento prévio da sequência, como no caso de microarranjo onde se utiliza sequências conhecidas para mensurar a expressão gênica. Além disso, permite a diferenciação de polimorfismo de um nucleotídeo (SNP) o que não é possível diferenciar no microarranjo (CHEN et al., 2007).

A metodologia de RNA-seq possui alta sensibilidade e pode ser utilizada para caracterizar o transcriptoma de um organismo (PINTO et al., 2011). Essa metodologia tem se mostrado útil para descobrir novas transcrições, identificações de mutações, deleções e inserções, *splicings* alternativos e também oferece uma cobertura elevada. Entretanto, o genoma de referência é de extrema importância para estudos de transcriptoma porque permite que seja feita a identificação dos genes que estão sendo expressos em uma dada condição.

Estudos de transcriptoma representam progressos significativos para o entendimento da expressão gênica em arroz, como os relacionados ao desenvolvimento do embrião (XU et al., 2012; GAO et al., 2013) e a respostas a estresse biótico (KAWAHARA et al., 2012).

2.7 Referências bibliográficas

ANDAYA, V.C.; MACKILL, D.J. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 54, No. 392, pp. 2579-2585, Nov, 2003.

BEDI, S.; BASRA, A. Chilling injury in germinating seeds: basic mechanisms and agricultural implications. **Seed Science**, Walliford, v. 3, n. 4, p. 219-229, 1993.

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

BLUM, A. **Cold resistance**. In: Plan breeding for stress environments. Boca Raton: CRC, 1988. cap 5, p. 99-132.

CHANDRARATNA, M. F. **Genetics and breeding of Rice**. London: Longmans, 1964. 389 p.

CHANG, T. T. Rice. In. SIMMONDS, N. W. (Ed) **Evolution of crop plants**. New York: Longman, 1996. P. 147-155.

CHEN, J. et al. A comparison of microarray and MPSS technology platforms for expression analysis of *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v. 8, 2007.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 2, Safra 2014/15, n. 12– Décimo Segundo Levantamento, Brasília, p. 1-134, set, 2015.

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

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Inheritance of panicle exertion in rice. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), v.65, n.5, p.502-507, Sep/Oct, 2008.

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

DASHTIMIAN, F.P; KHAJEH-HOSSEINI, M.; ESFAHANI, M. Methods for rice genotypes cold tolerance evaluation at germination stage. **Intl J Agri Crop Sci.** Vol., 5 (18), 2111-2116, 2013.

DATTA, D.; SIDDIQ, E.A. Genetic analysis of cold tolerance at seedling phase in rice. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 43, p. 345-349, 1983.

DE LOS REYES, B.G., MORSY, M., GIBBONS, J., VARMA, T., ANTOINE, W., MCGRATH, J.M., HALGREN, R., REDUS, M.A. A snapshot of the low temperature stress transcriptome of developing rice seedlings (*Oryza sativa* L.) via ests from subtracted cDNA library. **Theoretical And Applied Genetics**. 2003. v. 107(6). p. 1071-1082.

FAO- **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, FAO Statistical Yearbook, World Food and Agriculture, Rome, 2013.

GAO, Y.; XU, H.; SHEN, Y.; WANG, J. Transcriptomic analysis of rice (*Oryza sativa*) endosperm using the RNA-Seq technique. **Plant Mol Biol**, 81, 363–378, 2013.

GOMES, A. da S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 899 p. : il. color., 2004.

JONES, D.B.; PETERSON, M.L. Rice seedling vigor at sub-optimal temperatures. **Crop Science**, Madison, v. 16,n. 1, p. 102-105, 1976.

KAW, R.N., Genetic parameters of cold tolerance in rice. **Indian Journal of Genetics**, New Delhi, v. 51, p. 59-65, 1991.

KAWAHARA, Y.; OONO, Y.; KANAMORI, H.; MATSUMOTO, T.; ITOH, T.; MINAMI, E. Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. **PLOS ONE** 7(11): e49423, 2012.

KAWAKAMI, S. et al. Genetic variation in the chloroplast genome suggests multiple domestication of cultivated Asian rice (*Oryza sativa* L.). **Genome**, v.50, n.2, p.180-187, 2007.

KAZEMITABAR, S.; TOMSETT, A.; COLLIN, M.; JONES, M. Effect of short term cold stress on rice seedlings. **Euphytica**, Wageningen, v. 129, n. 2, p. 193-200, 2003.

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.

KOMATSU, S.; KARIBE, H.; HAMADA, T.; RAKWAL, R. Phosphorylation upon cold stress in Rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 8, p. 1304-1310, 1999.

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.

LU, B. R.; CHANG, T. T. **Rice in its temporal and apatial perspectives**. In: LUH, B. S. Rice: production and utilization. Westport:AVI, 1980, p.1-74.

LYONS, J.M. Chilling injury in plants. **Annual Review of plant physiology**. v.24, p.445-466. Palo Alto CA, 1973.

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

MACKILL, D.J.; LEI, X. M. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 4, p. 1340-1346, 1997.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Arroz. In: **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Rosa Lia Barbieri; Elisabeth Regina Tempel Stumpf – Editores Técnicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.187-218, 2008.

MATSUO, M. Origin and differentiation of cultivated Rice. In. MATSUO, T.; FUSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. (Eds). **The Science of the Rice**

Plant, Volume Three, Genetics, Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. Chap 3, p. 69-88.

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

MORSY, M.; ABEER, M.; GIBBONS, J.; SONG, Y.; DE LOS REYES, B. The OsLti6 genes encoding low-molecular weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. **Gene**, Amsterdam, v. 344, sn., p. 171-180, 2005.

NEDEL, J.L.; Fundamentos da Qualidade de Sementes, **Sementes: Fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas. Ed. Universitária, 2003, p. 95-138.

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

PAULL, R.E. Temperature-induced leakage from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v.68, p.149-153, 1981.

PEREIRA, J.A. **Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 226 p., 2002.

PINTO, A.C.; MELO-BARBOSA, H.P., MIYOSHI A.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. Application of RNA-Seq to reveal the transcript profile in bacteria. **Genet Mol Res.**, 10 (3)1707-18, 2011.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. Brasília: s.ed., 1985. 289p.

REDOÑA, E.D. MACKILL, D.J. Genetic variation for seedling vigor traits in rice. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 2, p. 285-290, 1996.

ROSSO, A.F. de. 2002. **Caracterização genética e fenotípica para tolerância ao frio e características agronômicas em arroz irrigado**. 2006. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

STEINMETZ, S.; MALUF, J.R.T.; MATZENAUER, R.; AMARAL, A.G.; FERREIRA, J.S.A. Temperatura do solo: Fator decisivo para o início da semeadura do arroz irrigado no Rio Grande do Sul. In: Embrapa Clima Temperado, 2001, Ministério da Agricultura e Abastecimento, **Comunicado Técnico**, 56. p.81-88.

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.

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 Cargil, 1985. p. 83-94.

VAN VLIET, AHM. Next generation sequencing of microbial transcriptome: challenge and opportunities. **FEMS Microbiology Letters**, 302: 1-7, 2010.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n.1, p.57-63, 2009.

XU, H.; GAO, Y.; WANG, J. Transcriptomic Analysis of Rice (*Oryza sativa*) Developing Embryos Using the RNA-Seq Technique. **PLOs ONE** 7(2): e30646, 2012.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Banos: International Rice Research Institute, p. 269, 1981.

ZHANG, Z.; QU, X.; WAN, S. CHEN, L.; ZHU, Y. Comparison of QTL Controlling Seedling Vigour under Different Temperature Conditions Using Recombinant Inbred Lines in Rice (*Oryza sativa*). **Annals of Botany**, V. 95, p. 423–429, 2005.

ZIMMER, P. D. Fundamentos da Qualidade da Semente. In.: PESKE, S. T.; LUCCA FILHO, O. A.; BARROS, A. C. S. A. (Eds.). **Sementes: Fundamentos científicos e Tecnológicos**, 2a Ed., Pelotas, 2006, p.99 – 158.

3. CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES SEGREGANTES QUANTO À TOLERÂNCIA AO FRIO NO ESTÁDIO DE GERMINAÇÃO DE ARROZ

3.1 Introdução

A época de semeadura é considerada uma das principais práticas de manejo que favorece o aumento da produtividade do arroz. A semeadura realizada fora da época preferencial pode prejudicar o estabelecimento do *stand* em função da ocorrência de estresses abióticos provocados pelas condições climáticas desfavoráveis. No Rio Grande do Sul, o arroz é semeado nos meses de setembro a dezembro, dependendo da região e condições climáticas predominantes. No entanto, a época de semeadura recomendada para cultivares de ciclo médio, na maioria das regiões, concentra-se no período de início de outubro a meados de novembro, no qual as temperaturas médias estão abaixo de 15°C (OLIVEIRA, 1997). Esta média de temperatura, apesar de não impedir a germinação do arroz, retarda o início da mesma e, conseqüentemente, a emergência das plântulas. A faixa de temperatura ótima para a germinação do arroz se situa entre 20 e 35°C e a temperatura de 10°C é citada como o valor crítico mínimo abaixo do qual ela não ocorre (YOSHIDA, 1981).

Nestas condições, o agricultor enfrenta dificuldades para realizar a semeadura fora da época recomendada, diminuindo dessa forma a janela de semeadura, em função das condições ambientais adversas, como a baixa

temperatura do ar e do solo (STEINMETZ et al., 2001). Desta forma, para ampliar a janela de semeadura e obter alta germinação/emergência e uniformidade no estande inicial de plântulas, é importante o uso de cultivares tolerantes ao frio na semeadura para evitar perdas nas fases iniciais e mais tarde na fase crítica da cultura.

As cultivares de arroz da subespécie *índica* por serem de origem tropical, em princípio, todos os estádios fenológicos da cultura são considerados sensíveis ao frio, sendo alguns mais afetados que outros (CRUZ; MILLACH, 2000). Dentre eles, destacam-se os estádios de germinação, desenvolvimento inicial das plântulas e o reprodutivo. Na germinação, o frio pode causar alongamento do período da germinação/emergência, o afilamento torna-se baixo, lento e com poucas plantas emergidas no *stand* inicial devido ao desenvolvimento lento da cultura frente a essa condição. No desenvolvimento inicial das plântulas, ocorre diminuição na taxa de desenvolvimento diário das folhas, redução na altura das plantas, ocasionando redução na capacidade competitiva do arroz em relação às plantas daninhas. Na fase reprodutiva, ocorre os maiores efeitos sobre o rendimento de grãos devido a esterilidade das espiguetas, aumento do tempo entre o início e o final da floração, má exerceção da panícula e deformações na panícula (TERRES; GALLI, 1985; CRUZ; MILLACH, 2000).

A tolerância ao frio é considerada um dos objetivos principais dos programas de melhoramento do RS devido aos prejuízos que ocorrem quase que anualmente devido as baixas temperaturas durante os períodos críticos da cultura. Apesar disso, a partir do início do uso das cultivares do tipo moderno, de origem tropical, pouco avanço tem sido obtido, devido a menor disponibilidade de fontes de tolerância dentro da subespécie *índica* e a dificuldade de obtenção de recombinantes em cruzamentos com genótipos da subespécie *japonica*. Além disso, a tolerância ao frio é de difícil avaliação a campo, pois nem sempre a ocorrência do frio coincide com as fases de maior sensibilidade das plantas (CRUZ; MILLACH, 2000). Por isso, é importante o uso de metodologias que avaliem direta e indiretamente a tolerância das cultivares em campo.

A dificuldade de se selecionar para tolerância ao frio a campo levou a necessidade de se utilizar condições controladas. Esta abordagem permite a

identificação mais precisa de genótipos tolerantes do que é possível em condições de campo, onde o grau e a duração do período de baixa temperatura é altamente variável (FARREL et al., 2006).

Avaliações baseadas na altura de plântula em condições controladas são um indicador satisfatório do desempenho em campo para porcentagem de emergência e índice de emergência (JONES; PETERSON, 1976). O crescimento do coleóptilo está correlacionado com o estabelecimento de plântulas sob baixas temperaturas (OGIWARA; TERASHIMA, 2001). O índice de velocidade de emergência também pode ser utilizado para identificar cultivares de arroz tolerante ao frio no estágio germinação-emergência, e, assim, recomendá-los para o cultivo, ou, no caso de não apresentarem características agronômicas compatíveis com a exigência da lavoura, podem ser utilizados como fontes para tolerância ao frio nos cruzamentos direcionados (FAGUNDES et al., 2010).

Diversos métodos de avaliação da tolerância ao frio no estágio de germinação foram desenvolvidos e permitem a caracterização de genótipos tolerantes e sensíveis (JONES; PETERSON, 1976; CRUZ; MILACH, 2004) e estão disponíveis para identificação de genótipos com tolerância em programas de melhoramento genético. Eles consistem basicamente na germinação de sementes em baixas temperaturas sob condições controladas, avaliando-se características como índice de germinação, comprimento da radícula e comprimento do coleóptilo. Esses métodos têm sido utilizados em estudos de controle genético da tolerância ao frio na germinação (STHAPIT; WITCOMBRE, 1998; CRUZ et al., 2006), mapeamento de QTLs (Miura et al., 2001; Fujino et al., 2004) e na caracterização de germoplasma (CASTILLO; ALVARADO, 2002; SHARIFI; AMINPANAHI, 2010).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento de populações segregantes em geração F3 e F4, para o caráter tolerância ao frio na germinação, utilizando metodologias de avaliação em laboratório e em campo.

3.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Didático de Análise de Sementes (LDAS) e no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) do Departamento de Fitotecnia, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel); na casa de vegetação e na área experimental da Estação Experimental de Terras Baixas - ETB (Capão do Leão-RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS) e na Área Experimental da Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia-GO) em Santo Antônio de Goiás-GO.

O trabalho foi realizado no período de outubro de 2010 a dezembro de 2014, sendo desenvolvido em quatro etapas:

Primeira etapa – Realização dos cruzamentos entre genitores tolerantes e sensíveis ao frio na germinação e avanço da geração F2 (2011).

Segunda etapa – Avanço da geração e caracterização fisiológica dos genitores e populações tolerantes e sensíveis ao frio na germinação na geração F3 (2012).

Terceira etapa – Avanço da geração e caracterização fisiológica dos genitores e populações tolerantes e sensíveis ao frio na germinação na geração F4 (2013).

As sementes dos genótipos utilizados nos experimentos foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa Clima Temperado.

Genitores e Cruzamento

O bloco de cruzamentos e as hibridações controladas foram conduzidos e realizados na casa de vegetação da Estação Experimental de Terras Baixas - ETB (Capão do Leão-RS), Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS), no período de outubro de 2010 a março de 2011.

Foram utilizadas duas cultivares tolerantes e três cultivares sensíveis (Tabela 1).

Tabela 1. Nome dos genótipos, grupo e resposta ao frio na germinação e emergência.

Genótipos	Grupo	Resposta ao frio na germinação/emergência
BRS-6 Chuí	<i>indica</i>	Sensível
BRS Atalanta	<i>indica</i>	Sensível
BRS SCS Tio Taka	<i>indica</i>	Sensível
Oro	<i>japonica</i>	Tolerante
LTB 06012	<i>indica</i>	Tolerante

Os cruzamentos foram realizados com hibridação controlada. Os genótipos foram semeados, em seis épocas diferentes e em duas profundidades, para aumentar a probabilidade de sincronia na maturação da fase reprodutiva da planta receptora (genitor feminino) e da planta doadora (genitor masculino), para a hibridação. Foram semeadas 10 sementes por vaso, e três vasos por genótipo em cada época, com duas profundidades: cinco sementes a três centímetros e cinco sementes a cinco centímetros de profundidade. No início da fase vegetativa foi feito o raleio, permanecendo no vaso a melhor planta, nas duas profundidades.

A emasculação foi realizada nas primeiras horas do dia, antes que os grãos de pólen sejam derriçados (BORÉM, 1999), com bomba de vácuo, por sucção total das anteras. As espiguetas, após serem emasculadas, foram protegidas por saco de papel encerado.

A polinização foi realizada na primeira hora da tarde, pelo método “chuva de pólen”, ou seja, derriçagem manual de pólen sobre a panícula do genitor feminino. Após a polinização, as panículas foram novamente protegidas por saco de papel encerado.

As unidades experimentais foram codificadas de tal forma que o primeiro nome no cruzamento corresponde ao do genitor feminino e o segundo, corresponde ao nome do genitor masculino (Tabela 2). Próximo a maturidade fisiológica, as sementes foram colhidas manualmente, e colocadas para secar.

Tabela 2. Descrição dos cruzamentos realizados e nomenclatura.

Cruzamentos
BRS-6 Chuí / LTB 06012
BRS-6 Chuí / Oro
BRS Atalanta / LTB 06012
BRS SCS Tio Taka / LTB 06012
BRS SCS Tio Taka / Oro
Oro / BRS SCS Tio Taka
Oro / BRS-6 Chuí
LTB 06012 / BRS Atalanta
LTB 06012 / BRS SCS Tio Taka
LTB 06012 / BRS-6 Chuí

Multiplicação das sementes F1

As sementes oriundas do cruzamento (F1) foram enviadas para multiplicação, na área experimental da Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia-GO) em Santo Antônio de Goiás-GO, para avançar para geração de sementes F2 (junho a outubro de 2011). As sementes de cada planta F1 foram colhidas separadamente gerando populações F2.

Multiplicação das sementes F2

Cada população de sementes da geração F2 foi semeada na área experimental da Estação Experimental de Terras Baixas – ETB (Capão do Leão-RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS). Cada população foi semeada em parcelas de quatro linhas de três metros de comprimento (outubro de 2011 a março de 2012). Foram colhidas em “bulk” as sementes da geração F3 das duas linhas centrais e de dois metros centrais de cada parcela.

Multiplicação das sementes F3

Cada população de sementes da geração F3 foi semeada na área experimental da Estação Experimental de Terras Baixas – ETB (Capão do Leão-RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS). Cada população foi semeada em parcelas de quatro linhas de cinco metros de comprimento (outubro de 2012 a março de 2013). Foram colhidas em “bulk” as sementes da geração F4 das duas linhas centrais e de dois metros centrais de cada parcela.

Análise das sementes para o caráter germinação ao frio

O trabalho foi realizado no Laboratório Didático de Análise de Sementes (LDAS) do Departamento de Fitotecnia, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel).

As análises foram realizadas nos genitores e nas populações segregantes na geração F3 (2012) e na geração F4 (2013).

Inicialmente as sementes foram passadas em soprador, após foi dividido em duas amostras de trabalho. A primeira foi armazenada em câmara de armazenamento com temperatura e umidade relativa controlada, de 16°C e UR de 60%, para avanço de geração na área experimental da Estação Experimental de Terras Baixas – ETB (Capão do Leão-RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS).

Na segunda amostra de trabalho foi realizada a superação de dormência em estufa com circulação de ar, a 50°C, por 96 horas (Brasil, 2009). As sementes foram desinfetadas com álcool 70% por 3 segundos e hipoclorito de sódio por 20 minutos, sendo lavadas posteriormente com água destilada 6 vezes (CRUZ, 2004).

Avaliação em Laboratório:

As sementes dos cinco genótipos genitores e as populações em geração F3 e F4 foram semeadas em caixa tipo gerbox, em folha dupla de papel *germitest* plissado, umedecido com água destilada, com três vezes o seu peso seco, empregando delineamento de blocos casualizados com três repetições de 50 sementes e, colocadas em Estufa com Foto-período e Alternância de Temperatura (BOD) para germinar. A temperatura utilizada foi de 13°C $\pm$ 0,2°C, por 28 dias (CRUZ; MILLACH, 2004). No 28º dia, a temperatura foi aumentada para 30°C, temperatura cardinal ótima da espécie (NEDEL et al, 2004), pelo período de mais dois dias, para observação das sementes que ainda não germinaram em baixa temperatura.

Índice da Velocidade de Germinação (IVG): Para a determinação do índice da velocidade de germinação (IVG) foram realizadas contagens diárias

das sementes que permaneceram durante 28 dias à temperatura de 13°C e os cálculos foram realizados pela fórmula proposta por Maguire (1962), onde:

$IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + (G_3/N_3) + \dots + (G_n/N_n)$, em que:

IVG = índice de velocidade de germinação;

$G_1, G_2, G_3, \dots, G_n$ = número de sementes computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem;

$N_1, N_2, N_3, \dots, N_n$ = número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

Foi considerada semente germinada sob o aspecto botânico, o rompimento da lema e da pálea pela protrusão da raiz primária, originada da radícula do embrião.

Avaliação em Campo:

As sementes dos cinco genótipos genitores e as populações em geração F3 e F4 foram semeadas no solo em canteiros da Estação Experimental de Terras Baixas – ETB (Capão do Leão/RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS). A semeadura foi realizada no solo no início do mês de agosto, onde o solo nesta época do ano apresenta baixas temperaturas. As sementes foram semeadas em linhas de 50 centímetros de comprimento, sendo distribuídas 50 sementes utilizando o delineamento de blocos casualizados com três repetições.

Índice da Velocidade de Emergência (IVE): Para a determinação do índice da velocidade de emergência (IVE) foi realizado contagens diárias das plântulas emergidas até o estágio V3 ou estabelecimento de todas as plântulas, os cálculos foram realizados pela fórmula proposta por Maguire (1962), onde:

$IVE = (E_1/N_1) + (E_2/N_2) + (E_3/N_3) + \dots + (E_n/N_n)$, em que:

IVE = índice de velocidade de emergência;

$E_1, E_2, E_3, \dots, E_n$ = número de plântulas computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem;

$N_1, N_2, N_3, \dots, N_n$ = número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

Análise estatística

Foi realizada análise de variância para os experimentos realizados na geração F3 e F4, em laboratório e em campo. Os dados foram submetidos à análise de variância e a relação entre as variáveis foi verificada através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. As análises foram realizadas no programa SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 2000).

3.3 Resultados e discussão

A análise de variância apresentou diferença estatística do efeito do genótipo para a maioria das variáveis (Tabela 3), indicando a existência de variabilidade entre os genitores utilizados para a tolerância ao frio na germinação.

Tabela 3. Quadrado médio e coeficiente de variação (CV) para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nos genitores. Pelotas, 2015.

Variável	Quadrado Médio	CV (%)
IVE - 2012	36,6*	15,2
IVG - 2012	5,4**	11,9
IVE - 2013	0,4ns	52,5
IVG - 2013	2,8**	8,5

**Significativo a 1% de probabilidade

O efeito não significativo do índice de velocidade de emergência no ano de 2013 pode ser explicado pelo elevado coeficiente de variação apresentado pela análise de variância.

Avaliando os resultados do teste de comparação de médias para o índice de velocidade de emergência no ano de 2012, que expressa a velocidade de emergência em temperatura baixa do solo, o genótipo Oro apresentou o melhor desempenho, porém este genótipo não diferiu estatisticamente dos demais genótipos estudados (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação de médias pelo teste de Tukey para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nos genitores. Pelotas, 2015.

Genótipo	IVE 2012	IVG 2012	IVG 2013
BRS-6 Chuí	12,3 ab	3,2 a	2,7 b
BRS Atalanta	11,2 b	0,2 c	3,5 a
BRS SCS Tio Taka	15,8 ab	0,2 c	1,2 c
Oro	21,3 a	1,8 b	3,2 ab
LTB 06012	19,0 ab	0,3 c	1,6 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observando os resultados do teste de comparação de médias, em números absolutos, os menores resultados para índice de velocidade de emergência no ano de 2012, foram para os genótipos BRS Atalanta, BRS-6 Chuí e BRS SCS Tio Taka, resultados estes que eram esperados, pois estes genótipos são considerados como sensíveis ao frio (MERTZ et al., 2009; FREITAS et al. 2011).

Para o índice de velocidade de germinação no ano de 2012, obtido em laboratório, o genótipo BRS-6 Chuí foi estatisticamente superior aos demais, embora seja um genótipo da subespécie *indica*. O genótipo Oro também teve um desempenho superior em condições de baixa temperatura, sendo diferente estatisticamente dos demais genótipos. O genótipo BRS SCS Tio Taka obteve nesta avaliação o menor resultado absoluto, sendo considerado sensível ao frio na germinação em baixa temperatura.

Analisando o índice de velocidade de germinação no ano 2013, pode-se observar que o desempenho do genótipo Oro foi superior aos demais porém, não é diferente estatisticamente do genótipo BRS Atalanta. O genótipo Tio Taka obteve nesta avaliação o menor resultado absoluto.

Pode-se considerar de modo geral, para as variáveis analisadas que o genótipo Oro apresentou maior tolerância na germinação em condições de baixas temperaturas, por outro lado o genótipo BRS SCS Tio Taka obteve menor tolerância. Resultados também observados em estudos realizados por Mertz et al., (2009) e Fagundes et al., (2010). Estes resultados podem ser explicados pela origem de cada genótipo, sendo Oro pertencente a subespécie *japonica* e BRS SCS Tio Taka pertencente a subespécie *indica*. Redoña e Mackill (1996) realizaram um extenso estudo sobre a variação genética em plântulas e

reportaram que as variedades *japonicas* temperadas e as *japonicas* tropicais foram mais vigorosas do que as *indicas*. Além disso, Mackill e Lei (1997), estudaram 117 cultivares previamente classificadas como pertencentes a subespécie *indica*, *japonicas* e *javanica* (*japonicas* tropical) em câmaras de crescimento utilizando solo e no campo, concluíram que os genótipos *japonica* e *javanica* são mais tolerantes do que os genótipos *indica*.

Para os resultados dos coeficientes de correlação realizados nos genitores sensíveis, podemos observar que não houve correlação significativa entre os resultados de índice de velocidade de germinação em laboratório e índice de velocidade de emergência em campo (Tabela 5). Da mesma forma, não teve associação significativa entre os anos 2012 e 2013, tanto para índice de velocidade de germinação em laboratório e índice de velocidade de emergência em campo.

Tabela 5. Coeficiente de correlação simples para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nos genitores sensíveis. Pelotas, 2015.

	IVE 2012	IVG 2012	IVE 2013	IVG 2013
IVE 2012	1	0,07	0,38	0,24
IVG 2012		1	-0,23	0,27
IVE 2013			1	-0,38
IVG 2013				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Para os resultados dos coeficientes de correlação realizados nos genitores tolerantes, podemos observar que não houve correlação significativa entre os resultados de índice de velocidade de germinação em laboratório e índice de velocidade de emergência em campo (Tabela 6).

Por outro lado, podemos observar associação significativa para índice de velocidade de germinação em laboratório nos anos de 2012 e 2013. Esses resultados mostram que em laboratório onde as condições são controladas, os genótipos tolerantes mantem seu desempenho em baixas temperaturas de germinação, resultado este que é esperado pois a diferença neste caso é apenas devido ao ano de avaliação.

Tabela 6. Coeficiente de correlação simples para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nos genitores tolerantes. Pelotas, 2015.

	IVE 2012	IVG 2012	IVE 2013	IVG 2013
IVE 2012	1	0,14	-0,52	0,42
IVG 2012		1	0,31	0,89*
IVE 2013			1	0,25
IVG 2013				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Analisando os coeficientes de correlação simples nas populações segregantes, contendo um genitor tolerante no cruzamento, podemos observar associação altamente significativa entre os resultados do índice de velocidade de germinação em laboratório e índice de velocidade de emergência em campo na geração F3, com um coeficiente de 0,18 (Tabela 7). Por outro lado, na geração F4 essa correlação entre índice de velocidade de germinação em laboratório e índice de velocidade de emergência em campo não foi significativa.

Tabela 7. Coeficiente de correlação simples para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) avaliados nas populações segregantes. Pelotas, 2015.

	IVE F3	IVG F3	IVE F4	IVG F4
IVE F3	1	0,18**	0,15**	0,06
IVG F3		1	0,18**	0,25**
IVE F4			1	0,02
IVG F4				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Para a variável índice de velocidade de germinação, obtida no laboratório, observamos associação significativa entre as gerações F3 e F4, entretanto com baixo coeficiente de correlação de 0,25. Neste caso, podemos considerar que as populações segregantes consideradas tolerantes em F3 poderão apresentar tolerância em geração F4.

Para a variável índice de velocidade de emergência, obtida no campo, observamos associação significativa entre as gerações F3 e F4, com baixo coeficiente de correlação de 0,15. Neste caso, podemos considerar que as populações segregantes consideradas tolerantes em F3 poderão apresentar tolerância em geração F4.

Nos dois casos, IVG e IVE, possivelmente os baixos coeficientes de correlação foram influenciados negativamente pelo fato de que as populações

ainda estão segregando e por isso existe uma grande mudança nos valores de tolerância média das populações em cada geração.

Embora observamos correlações significativas entre os resultados do índice de velocidade de germinação em laboratório e índice de velocidade de emergência em campo na geração F3, o coeficiente de correlação encontrado é muito baixo, portanto esse resultado indica que usar a metodologia apenas no laboratório pode não garantir que os genótipos tolerantes sejam os mesmos a serem observados no campo.

Da mesma forma, o baixo coeficiente de correlação observado entre a geração F3 e geração F4, que pode ser explicado devido a segregação de F3 para F4 que modifica as frequências de plantas tolerantes e sensíveis.

Analisando os resultados da análise de variância realizada no conjunto de dados dos cruzamentos, é possível observar diferença estatística do efeito dos cruzamentos para a maioria das variáveis (Tabela 8), indicando a existência de variabilidade para as populações obtidas a partir dos cruzamentos realizados para a tolerância ao frio na germinação.

Tabela 8. Quadrado médio e coeficiente de variação (CV) para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) para as populações segregantes em geração F3 e F4. Pelotas, 2015.

Variável	Quadrado Médio	CV (%)
IVE F3	27,7ns	29,9
IVG F3	10,3**	23,4
IVE F4	3,9**	8,5
IVG F4	22,1**	25,4

**Significativo a 1% de probabilidade

O índice de velocidade de emergência na geração F3, não teve diferença significativa, isto é um indicativo que as populações não apresentaram diferenças entre si para as condições que foram expostas. Por outro lado, as demais variáveis foram significativas e podem apresentar diferenças entre as populações.

A partir dos resultados de comparação de médias obtidos pelo teste Duncan, podemos observar para o índice de velocidade de germinação na geração F3 que o cruzamento realizado BRS SCS Tio Taka/Oro obteve melhor comportamento na germinação em baixa temperatura, sendo diferente

estatisticamente dos demais genótipos (Tabela 9). Para efeito de nomenclatura o primeiro nome corresponde ao genitor feminino, ou seja, o genótipo Oro foi utilizado como genitor masculino e o genótipo BRS SCS Tio Taka como genitor feminino.

Tabela 9. Comparação de médias pelo teste Duncan para Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) para as populações segregantes em geração F3 e F4. Pelotas, 2015.

Cruzamentos	IVG F3	IVE F4	IVG F4
BRS-6 Chuí/Oro	2,7 b	1,6 ab	3,0 d
BRS-6 Chuí/LTB 06012	1,4 f	1,0 ab	2,8 d
BRS Atalanta/LTB 06012	2,4 bcd	1,2 ab	4,1 b
BRS SCS Tio Taka/Oro	3,2 a	1,9 a	5,1 a
BRS SCS Tio Taka/LTB 06012	1,8 e	1,4 ab	1,8 e
Oro/BRS-6 Chuí	1,2 f	0,9 b	1,9 e
Oro/BRS SCS Tio Taka	2,0 ed	1,2 ab	2,8 d
LTB 06012/BRS-6 Chuí	1,9 e	1,0 ab	2,1 e
LTB 06012/BRS Atalanta	2,5 bc	0,8 b	3,6 c
LTB 06012/BRS SCS Tio Taka	2,1 cde	0,9 b	1,8 e

Médias seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

O cruzamento entre os genitores BRS-6 Chuí/Oro também teve desempenho superior aos demais cruzamentos realizados para o índice de velocidade de geminação na geração F3, porém este cruzamento não diferiu estatisticamente dos demais cruzamentos. Por outro lado, o cruzamento Oro/BRS-6 Chuí teve o menor desempenho para esta variável. Este efeito pode ter origem na herança materna (herança citoplasmática), entretanto, são necessários mais cruzamentos em um sistema dialélico para confirmar esse resultado.

Observando o índice de velocidade de geminação na geração F4, o cruzamento realizado BRS SCS Tio Taka/Oro obteve melhor comportamento na germinação em baixa temperatura, sendo diferente estatisticamente dos demais genótipos. O cruzamento entre os genótipos BRS Atalanta/LTB 06012 apresentou o segundo melhor comportamento na germinação em baixa temperatura, embora, o genitor masculino utilizado neste cruzamento ser da subespécie *indica*, ele é considerado tolerante em estudos realizados por Freitas, (2009).

Considerando os resultados obtidos para índice de velocidade de germinação na geração F3 e na geração F4, podemos indicar que a população obtida a partir do cruzamento realizado entre os genitores BRS SCS Tio Taka/Oro apresentou os melhores resultados para a germinação em baixas temperaturas, sendo um cruzamento com maior potencial para tolerância ao frio no período germinativo.

Os dados mostram que o índice de velocidade de germinação, realizado em laboratório, apresenta maior eficiência em caracterizar os cruzamentos mais tolerantes e sensíveis ao frio no período germinativo, comparado com o teste de índice de velocidade de emergência, realizado em campo. Uma das explicações pode ser o controle da temperatura e do tempo de duração do frio que tem no laboratório e a dificuldade deste controle em condições de campo. Em estudos anteriores realizados por Cruz; Millach (2000) e Farrel et al. (2006), já relataram sobre a dificuldade do controle de temperatura e tempo de duração do período de frio durante o período de teste e a necessidade de testar os genótipos para a tolerância a frio em ambientes com controle de temperatura.

Mesmo considerando o índice de velocidade de germinação no laboratório mais eficiente em identificar genótipos tolerantes e suscetíveis, apenas este teste não é suficiente para afirmar se um genótipo é ou não tolerante ao frio. Fato este que pode ser observado pelos coeficientes de correlação estudados neste trabalho, onde mostraram baixa correlação entre resultados no laboratório e em campo.

3.4 Conclusão

A população obtida a partir do cruzamento realizado entre os genitores BRS SCS Tio Taka/Oro apresenta maior tolerância na germinação em baixas temperaturas.

A baixa correlação entre o índice de velocidade de germinação na geração F3 e F4, indica que uma população considerada tolerante em F3 pode não manter o mesmo comportamento em F4.

O índice de velocidade de germinação obtido em laboratório, apresenta maior eficiência em identificar genótipos e populações com melhor desempenho no período germinativo, comparado com a avaliação em campo.

O índice de velocidade de germinação obtido em laboratório não é suficiente para indicar um genótipo tolerante ao frio no período germinativo, pois apresenta baixa correlação com índice de velocidade de emergência em campo.

3.5 Referências bibliográficas

BORÉM, A. **Hibridação artificial de plantas** /Editado por / Aluizio Borém–Viçosa: UFV,1999. 546 p.: Il.

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

CRUZ, R.P.; 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.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **Scientia Agricola**, v. 61, n.1, p.1-8, 2004.

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

DOYLE, J. J. and J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19: 11-15.

FAGUNDES, P. R. R.; MAGALHÃES JR, A. M.; STEINMETZ, S. **Tolerância de genótipos de arroz irrigado ao frio nos estádios de germinação e emergência**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 19p. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

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

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

FREITAS, Demócrito Amorim Chiesa. **Desempenho de genótipos de arroz irrigado quanto ao frio na germinação e na emergência**.2009. 71f. Tese

(Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009,

FREITAS, D.A.C., PESKE, S.T., VILLELA, F.A., ZIMMER, P.D., FAGUNDES, P.R.R., AMARAL, F.P., RECH, E.G., MENEGHELLO, G.E. Identification of genes involved in rice seed germination at low temperatures *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 3 (5), pp.83-88, May 2011.

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

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

MACKILL, D.J.; LEI, X. M. Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 4, p. 1340-1346, 1997.

MERTZ, L.M; HENNING, F.A., SOARES, R.C., BALDIGA, R. F., PESKE, F.B., MORAES, D.M. DE. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 2, p.254-262, 2009.

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

NEDEL, J.L.; SCHUCH, L.O.B.; ASSIS, F.N.; CARMONA, P.S. **Produção de arroz irrigado**, A planta de arroz: morfologia e fisiologia - 3.ed. ver. e ampl. Pelotas: ed. Universitária, Universidade Federal de Pelotas, p. 18-62, 2004.

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

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

REDOÑA, E.D. MACKILL, D.J. Genetic variation for seedling vigor traits in rice. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 2, p. 285-290, 1996.

SAS Institute. **System for Information**. Versão 8.0. Cary, 2000. 3 CD.

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

STEINMETZ, S.; MALUF, J. R. T.; MATZENAUER, R.; AMARAL, A. G.; FERREIRA, J. S. A. Temperatura do solo: Fator decisivo para o início da

semeadura do arroz irrigado no Rio Grande do Sul. In: **Embrapa Clima Temperado**, 2001. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Comunicado Técnico, 56. p,81-88.

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

TERRES, A, L.; GALLI, J.; GASTAL, F. L. Cultivares. 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. 57-82.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Banos: International Rice Research Institute, p.269, 1981.

4. CAPÍTULO II

METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS TOLERANTES À BAIXAS TEMPERATURAS NA GERMINAÇÃO DE ARROZ

4.1 Introdução

Embora a espécie *Oryza sativa* L. tenha origem tropical, o seu cultivo estende-se a regiões subtropicais, temperadas e de grande altitude, nas quais podem ocorrer temperaturas abaixo da ótima de desenvolvimento da cultura em um ou mais estádios, causando prejuízos na produtividade de grãos. A ocorrência de temperaturas baixas é um problema para a cultura em inúmeros países, dentre os quais Austrália, China, Indonésia, Japão, Estados Unidos (YOSHIDA, 1981), e sul da América Latina, principalmente Chile (CASTILLO; ALVARADO, 2002) e sul do Brasil (CRUZ; MILACH, 2000).

O Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz e o maior produtor fora do continente asiático (FAO, 2011). O arroz irrigado é uma cultura de grande importância econômica para o Rio Grande do Sul, com uma produtividade média de 7,7 t.ha⁻¹ (CONAB, 2015). Apesar dos bons níveis de produtividade, há uma variação acentuada ao longo dos anos, causada, fundamentalmente, pelas condições climáticas.

A ocorrência de baixas temperaturas e a disponibilidade de radiação solar durante as fases de estabelecimento da cultura e, principalmente, na fase

reprodutiva, são dois elementos climáticos que estão intimamente relacionados com a variabilidade nos níveis de produtividade.

O problema abrange todo o Estado, sendo mais agravado nas regiões Litoral Sul e da Campanha que apresentam maior probabilidade de ocorrência de temperaturas baixas, inferiores a 15°C durante a noite. Entretanto, temperaturas inferiores a 20 °C já são consideradas prejudiciais ao desenvolvimento das plantas (FAGUNDES, 2010).

Devido aos vários efeitos da baixa temperatura na cultura do arroz e o seu impacto na produtividade, a tolerância ao frio é considerada de grande importância nessas regiões onde é comum a ocorrência de frio durante o período de cultivo. Esforços para o desenvolvimento de cultivares com tolerância ao frio têm focado principalmente na germinação, estabelecimento de plântulas e no estágio reprodutivo. No caso da germinação e estabelecimento de plântulas, temperaturas baixas podem diminuir e retardar a germinação e o crescimento de plântulas, levando a redução de estande e ao atraso e não uniformidade de maturação (ANDAYA; TAI, 2006).

Para desenvolver cultivares de arroz com bom desempenho sob condições de baixa temperatura, é necessário estudar os recursos genéticos e introduzir genes envolvidos na germinação em baixa temperatura para as cultivares de elite (MIURA et al., 2001).

A utilização dos recursos genéticos disponíveis em bancos de germoplasma é uma estratégia importante para incorporação de variabilidade em programas de melhoramento, o que pode potencialmente gerar novas cultivares com o aumento da base genética e obtenção de novas combinações alélicas (MCCOUCH, 2005).

A identificação de genótipos superiores é uma das principais atividades em um programa de melhoramento, que abrange tanto a identificação dos melhores genitores para inclusão em cruzamentos, como a seleção em populações segregantes e a utilização dos indivíduos selecionados no programa. No caso, cruzamentos entre cultivares da subespécie *indica* e *japônica*, onde a variabilidade gerada é maior ainda devido às diferenças genéticas, morfológicas, fisiológicas e de evolução entre estas duas subespécies de *Oryza sativa* L. (MORISHIMA, 2001).

A maioria dos estudos genéticos com tolerância ao frio na fase de germinação e emergência tem sido realizada na Ásia e nos USA (ANDAYA; MACKILL, 2003; FUJINO et al., 2004), embora possa ser mencionado o trabalho de Cruz et al. (2006) no Rio Grande do Sul.

O presente trabalho teve como objetivo estudar os coeficientes de correlação entre caracteres fisiológicos de germinação, buscando adequar uma metodologia para identificar genótipos tolerantes ao frio na germinação, correlacionando diferentes populações em geração F3 e F4.

4.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Didático de Análise de Sementes (LDAS) e no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (CGF) do Departamento de Fitotecnia, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel); na casa de vegetação e na área experimental da Estação Experimental de Terras Baixas - ETB (Capão do Leão-RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS) e na Área Experimental da Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia-GO) em Santo Antônio de Goiás-GO.

O trabalho foi realizado no período de outubro de 2010 a dezembro de 2014, sendo desenvolvido em quatro etapas:

Primeira etapa – Realização dos cruzamentos entre genitores tolerantes e sensíveis ao frio na germinação e avanço da geração F2.

Segunda etapa – Avanço da geração e caracterização fisiológica dos genitores e populações tolerantes e sensíveis ao frio na germinação na geração F3.

Terceira etapa – Avanço da geração e caracterização fisiológica dos genitores e populações tolerantes e sensíveis ao frio na germinação na geração F4.

As sementes dos genótipos utilizados nos experimentos foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa Clima Temperado.

Genitores e Cruzamento

O bloco de cruzamentos e as hibridações controladas foram conduzidos e realizados na casa de vegetação da Estação Experimental de Terras Baixas - ETB (Capão do Leão-RS), Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS), no período de outubro de 2010 a maio de 2011.

Foram utilizadas duas cultivares tolerantes e três cultivares sensíveis (Tabela 1).

Tabela 1. Nome dos genótipos, grupo e resposta ao frio na germinação e emergência.

Genótipos	Grupo	Resposta ao frio na germinação/emergência
BRS-6 Chuí	<i>indica</i>	Sensível
BRS Atalanta	<i>indica</i>	Sensível
BRS SCS Tio Taka	<i>indica</i>	Sensível
Oro	<i>japonica</i>	Tolerante
LTB 06012	<i>indica</i>	Tolerante

Os cruzamentos foram realizados com hibridação controlada. Os genótipos foram semeados, em seis épocas diferentes e em duas profundidades, para aumentar a probabilidade de sincronia na maturação da fase reprodutiva da planta receptora (genitor feminino) e da planta doadora (genitor masculino), para a hibridação. Foram semeadas 10 sementes por vaso, e três vasos por genótipo em cada época, com duas profundidades: cinco sementes a três centímetros e cinco sementes a cinco centímetros de profundidade. No início da fase vegetativa foi feito o raleio, permanecendo no vaso a melhor planta, nas duas profundidades.

A emasculação foi realizada nas primeiras horas do dia, antes que os grãos de pólen sejam derriçados (BORÉM, 1999), com bomba de vácuo, por sucção total das anteras. As espiguetas, após serem emasculadas, foram protegidas por saco de papel encerado.

A polinização foi realizada na primeira hora da tarde, pelo método “chuva de pólen”, ou seja, derriçagem manual de pólen sobre a panícula do genitor feminino. Após a polinização, as panículas foram novamente protegidas por saco de papel encerado.

As unidades experimentais foram codificadas de tal forma que o primeiro nome no cruzamento corresponde ao do genitor feminino e o segundo,

corresponde ao nome do genitor masculino (Tabela 2). Próximo a maturidade fisiológica, as sementes foram colhidas manualmente, e colocadas para secar em galpão.

Tabela 2. Descrição dos cruzamentos realizados e nomenclatura.

Cruzamentos
BRS-6 Chuí / BRS Atalanta
BRS-6 Chuí / LTB 06012
BRS-6 Chuí / Oro
BRS Atalanta / BRS SCS Tio Taka
BRS Atalanta / LTB 06012
BRS Atalanta / BRS-6 Chuí
BRS SCS Tio Taka / BRS Atalanta
BRS SCS Tio Taka / LTB 06012
BRS SCS Tio Taka / Oro
Oro / BRS SCS Tio Taka
Oro / BRS-6 Chuí
LTB 06012 / BRS Atalanta
LTB 06012 / BRS SCS Tio Taka
LTB 06012 / BRS-6 Chuí

Multiplicação das sementes F1

As sementes oriundas do cruzamento (F1) foram enviadas para multiplicação, na área experimental da Embrapa Arroz e Feijão (Goiânia-GO) em Santo Antônio de Goiás-GO, para avançar para geração de sementes F2. As sementes de cada planta F1 foram colhidas separadamente gerando populações F2.

Multiplicação das sementes F2

Cada população de sementes da geração F2 foi semeada na área experimental da Estação Experimental de Terras Baixas – ETB (Capão do Leão-RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS). Cada população foi semeada em parcelas de quatro linhas de três metros de comprimento. Foram colhidas em “bulk” as sementes da geração F3 das duas linhas centrais e de dois metros centrais de cada parcela.

Multiplicação das sementes F3

Cada população de sementes da geração F3 foi semeada na área experimental da Estação Experimental de Terras Baixas – ETB (Capão do Leão-RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS). Cada população foi semeada em parcelas de quatro linhas de cinco metros de comprimento. Foram colhidas em “bulk” as sementes da geração F4 das duas linhas centrais e de dois metros centrais de cada parcela.

Análise das sementes para o caráter germinação ao frio

O trabalho foi realizado no Laboratório Didático de Análise de Sementes (LDAS) do Departamento de Fitotecnia, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel).

As análises foram realizadas nos genitores e nas populações segregantes na geração F3 e na geração F4.

Inicialmente as sementes foram passadas em soprador, após foi dividido em duas amostras de trabalho. A primeira foi armazenada em câmara de armazenamento com temperatura e umidade relativa controlada, de 18°C e UR de 65%, para avanço de geração na área experimental da Estação Experimental de Terras Baixas – ETB (Capão do Leão-RS), da Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS).

Na segunda amostra de trabalho foi realizada a superação de dormência em estufa com circulação de ar, a 50°C, por 96 horas (BRASIL, 2009). As sementes foram desinfetadas com álcool 70% por 3 segundos e hipoclorito de sódio por 20 minutos, sendo lavadas posteriormente com água destilada 6 vezes (CRUZ, 2004).

Germinação (GER) 25°C: As sementes dos cinco genótipos genitores e as populações em geração F3 e F4 foram semeadas em caixa tipo gerbox, em folha dupla de papel germiteste plissado, umedecido com água destilada, com três vezes o seu peso seco, empregando delineamento de blocos casualizados com três repetições de 50 sementes e, colocados em germinador a temperatura de 25°C (BRASIL, 2009). No décimo quarto dia a partir da semeadura, foi realizada a contagem da germinação.

Germinação (GER) 13°C: As sementes dos cinco genótipos genitores e as populações em geração F3 e F4 foram semeadas em caixa tipo gerbox, em folha dupla de papel germiteste plissado, umedecido com água destilada, com três vezes o seu peso seco, empregando delineamento de blocos casualizados com três repetições de 50 sementes e, colocadas em Estufa com Foto-período e Alternância de Temperatura (BOD) para germinar. A temperatura utilizada foi de $13^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, por 28 dias (CRUZ; MILLACH, 2004). No 28º dia, a temperatura foi aumentada para 30°C , temperatura cardinal ótima da espécie (NEDEL et al, 2004), pelo período de mais dois dias, para observação das sementes que ainda não germinaram em baixa temperatura.

Índice de Velocidade de Germinação (IVG): Para a determinação do índice da velocidade de germinação (IVG) foi realizado contagens diárias das sementes que permaneceram durante 28 dias à temperatura de 13°C e das sementes que permaneceram durante 14 dias na germinação à temperatura de 25°C . Os cálculos foram realizados pela fórmula proposta por Maguire (1962), onde:

$$\text{IVG} = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + (G_3/N_3) + \dots + (G_n/N_n), \text{ em que:}$$

IVG = índice de velocidade de germinação;

$G_1, G_2, G_3, \dots, G_n$ = número de sementes computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem;

$N_1, N_2, N_3, \dots, N_n$ = número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

Foi considerada semente germinada sob o aspecto botânico, o rompimento da lema e da pálea pela protrusão da raiz primária, originada da radícula do embrião.

Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ): Para determinação do comprimento do coleóptilo e comprimento da raiz, foram realizadas mensurações de comprimento nas plântulas após 28 dias à temperatura de 13°C e nas plântulas após 14 dias na germinação à temperatura de 25°C . Cada parte da plântula foi medida com régua e determinado o comprimento em milímetros.

Análise estatística

Foi realizada análise de variância para os experimentos realizados na geração F3 e F4. Os dados utilizados foram relativos, ou seja, foram obtidos pela divisão entre os valores da variável à temperatura de 13°C pelo valor da variável à temperatura de 25°C.

Os dados foram submetidos à análise de variância e a relação entre as variáveis foi verificada através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. As análises foram realizadas no programa SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 2000).

4.3 Resultados e discussão

A análise de variância para os genitores apresentou diferença estatística do efeito do genótipo para todas as variáveis analisadas (Tabela 3), indicando a existência de variabilidade entre os genitores utilizados nos cruzamentos para a tolerância ao frio na germinação.

Tabela 3. Quadrado médio e coeficiente de variação (CV) para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores. Pelotas, 2015.

Variável	Quadrado Médio	CV (%)
GER - 2012	0,05**	13,2
IVG - 2012	0,02**	16,3
COL - 2012	0,05**	18,5
RAIZ - 2012	0,002*	40,1
GER - 2013	0,14**	7,5
IVG - 2013	0,02**	10,5
COL - 2013	0,05**	18,6
RAIZ - 2013	0,03**	21,2

** Significativo a 1% de probabilidade

Os resultados da análise de variância para as populações segregantes em geração F3 e em geração F4, mostram diferença estatística do efeito do cruzamento para todas as variáveis analisadas (Tabela 4), indicando a existência

de variabilidade entre as populações segregantes para a tolerância ao frio na germinação.

Tabela 4. Quadrado médio e coeficiente de variação (CV) para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) para as populações segregantes em geração F3 e F4. Pelotas, 2015.

Variável	Quadrado Médio	CV (%)
GER - F3	0,02**	10,7
IVG - F3	0,04**	23,5
COL - F3	0,15**	37,2
RAIZ - F3	0,03**	42,8
GER - F4	0,44**	14,7
IVG - F4	0,07**	21,9
COL - F4	0,66**	31,8
RAIZ - F4	0,08**	39,8

** Significativo a 1% de probabilidade

Os resultados dos coeficientes de correlação realizados nos genitores sensíveis no ano de 2012, mostram que houve correlação altamente significativa entre os resultados de índice de velocidade de germinação e a germinação em baixa temperatura (Tabela 5). O comprimento do coleóptilo também obteve correlação altamente significativa com a germinação e com o índice de velocidade de germinação.

Tabela 5. Coeficiente de correlação o simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores sensíveis no ano de 2012. Pelotas, 2015.

	GER	IVG	COL	RAIZ
GER	1	0,88**	0,77**	0,55
IVG		1	0,95**	0,69*
COL			1	0,78*
RAIZ				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Os resultados observados nos genitores sensíveis no ano de 2013 diferem um pouco apenas no nível de expressão dos coeficientes de correlação, existe correlação altamente significativa entre os resultados de índice de velocidade de germinação e a germinação em baixa temperatura (Tabela 6). Já o comprimento do coleóptilo obteve correlação significativa com a germinação e

com o índice de velocidade de germinação, e, observamos nesta geração a correlação significativa entre comprimento de raiz e germinação, que em 2012 não foi possível observar.

Tabela 6. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores sensíveis no ano de 2013. Pelotas, 2015.

	GER	IVG	COL	RAIZ
GER	1	0,97**	0,67*	0,86**
IVG		1	0,67*	0,87**
COL			1	0,93**
RAIZ				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Para o resultado do coeficiente de correlação realizados nos genitores tolerantes no ano de 2012, observamos que houve correlação altamente significativa entre os resultados de índice de velocidade de germinação e a germinação em baixa temperatura (Tabela 7). Da mesma forma, o comprimento do coleóptilo obteve correlação altamente significativa com a germinação e com o índice de velocidade de germinação.

Tabela 7. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores tolerantes no ano de 2012. Pelotas, 2015.

	GER	IVG	COL	RAIZ
GER	1	0,95**	0,96**	0,75
IVG		1	0,99**	0,65
COL			1	0,73
RAIZ				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Para o coeficiente de correlação realizado nos genitores tolerantes no ano de 2013, observamos que houve correlação altamente significativa apenas entre os resultados de índice de velocidade de germinação e a germinação em baixa temperatura (Tabela 8).

Tabela 8. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nos genitores tolerantes no ano de 2013. Pelotas, 2015.

	GER	IVG	COL	RAIZ
GER	1	0,98**	0,33	0,65
IVG		1	0,45	0,75
COL			1	0,84*
RAIZ				1

** Significativo a 1% de probabilidade

O coeficiente de correlação realizado nas populações sensíveis na geração F3, mostra que houve correlação significativa entre os resultados de índice de velocidade de germinação e a germinação em baixa temperatura, porém o coeficiente de correlação é baixo 0,14 (Tabela 9). Podemos observar que o comprimento do coleóptilo é correlacionado significativamente com o índice de velocidade de germinação, não tendo correlação com a germinação neste caso.

Tabela 9. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nas populações sensíveis em F3. Pelotas, 2015.

	GER	IVG	COL	RAIZ
GER	1	0,14*	0,05	0,009
IVG		1	0,28**	-0,04
COL			1	0,46**
RAIZ				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Já para o coeficiente de correlação observado nas populações sensíveis em F4 (Tabela 10), podemos observar que o índice de velocidade de germinação é altamente correlacionado com a germinação em baixa temperatura. Assim como, o comprimento do coleóptilo é altamente correlacionado com a germinação e o índice de velocidade de germinação, e, o comprimento da raiz é altamente correlacionado com a germinação, o índice de velocidade de germinação e o comprimento do coleóptilo.

Tabela 10. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nas populações sensíveis em F4. Pelotas, 2015.

	GER	IVG	COL	RAIZ
GER	1	0,88**	0,64**	0,48**
IVG		1	0,72**	0,59**
COL			1	0,70**
RAIZ				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Para o resultado do coeficiente de correlação realizado nas populações tolerantes na geração F3, observamos que houve correlação altamente significativa entre os resultados de índice de velocidade de germinação e a germinação em baixa temperatura (Tabela 11). É possível observar que o comprimento do coleóptilo obteve correlação altamente significativa com o índice de velocidade de germinação, não apresentando correlação com a germinação. O comprimento da raiz apresentou correlação com a germinação, o índice de velocidade de germinação e o comprimento do coleóptilo.

Tabela 11. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nas populações tolerantes em F3. Pelotas, 2015.

	GER	IVG	COL	RAIZ
GER	1	0,32**	0,09	0,14*
IVG		1	0,75**	0,67**
COL			1	0,79**
RAIZ				1

** Significativo a 1% de probabilidade

Já para o coeficiente de correlação observado nas populações tolerantes em F4 (Tabela 12), podemos observar que o índice de velocidade de germinação é altamente correlacionado com a germinação em baixa temperatura. Assim como, o comprimento do coleóptilo é altamente correlacionado com a germinação e o índice de velocidade de germinação, e, o comprimento da raiz é altamente correlacionado com a germinação, o índice de velocidade de germinação e o comprimento do coleóptilo.

Tabela 12. Coeficiente de correlação simples para Germinação (GER), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Comprimento do Coleóptilo (COL) e Comprimento da Raiz (RAIZ) avaliados nas populações tolerantes em F4. Pelotas, 2015.

	GER	IVG	COL	RAIZ
GER	1	0,86**	0,68**	0,58**
IVG		1	0,79**	0,69**
COL			1	0,79**
RAIZ				1

** Significativo a 1% de probabilidade

De acordo com estudos realizados por Miedema (1982), a comparação do crescimento em temperatura baixa em relação à temperatura normal apresenta uma melhor estimativa da tolerância ao frio na germinação, o que foi justamente o que foi avaliado neste estudo para o índice de velocidade de germinação, comprimento do coleóptilo e comprimento da raiz.

De modo geral nos experimentos realizados, o comprimento do coleóptilo teve elevada associação com a germinação em baixas temperaturas, esta característica é de grande importância para o estabelecimento das plântulas em campo, pois é o órgão que protege a plântula no momento da sua emergência, estendendo-se para cobrir a primeira folha (RENOÑA E MACKILL, 1996).

Assim como o comprimento do coleóptilo, o comprimento da raiz teve na maioria das avaliações, elevada correlação com a germinação. Yoshida (1981) relata que a maior influência da temperatura na germinação ocorre nas fases de ativação e crescimento do coleóptilo e da radícula. A diminuição no crescimento do coleóptilo e da radícula nestas fases, pode ser decorrente da menor alongação e divisão celular ocasionada pelo efeito direto da temperatura baixa ou pelo efeito indireto devido ao desequilíbrio metabólico celular (LYONS, 1973).

4.4 Conclusão

O comprimento do coleóptilo e o índice de velocidade de germinação são as metodologias mais adequadas pela elevada associação com a germinação em baixas temperaturas.

Os resultados das correlações na geração F3 diferem na maioria das vezes dos resultados apresentados na geração F4, devido a segregação das populações.

4.5 Referências bibliográficas

- ANDAYA, V.C.; MACKILL, D.J. QTL's conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica x indica* cross. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 6, p. 1084-1090, 2003.
- ANDAYA, V.C.; TAI, TH. Fine mapping of the q CTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v. 113, p. 467-475, 2006.
- BORÉM, A. **Hibridação artificial de plantas** /Editado por / Aluizio Borém. – Viçosa: UFV546 p.: II, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. –Brasília : Mapa/ACS, 399 p., 2009.
- CASTILLO, D.; ALVARADO,R. Caracterización de germoplasma de arroz para tolerancia a frío em la etapa de germinación. **Agricultura Técnica**, Santiago de Chile, v.62, n. 4, p. 596-605, 2002.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 2, Safra 2014/15, n. 12– Décimo Segundo Levantamento, Brasília, p. 1-134, set, 2015.
- CRUZ, R.P; 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.
- CRUZ, R; MILACH, S.C.K. Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **ScientiaAgricola**, v. 61, n.1, p.1-8, 2004.
- CRUZ, R; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Inheritance of rice cold tolerance at the germination stage. **Genetics and Molecular Biology**, 29, 2, 314-320, 2006.
- DOYLE, J. J. and J. L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19: 11-15,1987.
- FAGUNDES, P. R. R.; MAGALHÃES JR, A. M.; STEINMETZ, S. **Tolerância de genótipos de arroz irrigado ao frio nos estádios de germinação e emergência**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 19p. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.
- FAO. STAT: Food and agricultural commodities production. Disponível em:<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 10 maio, 2015.
- FUJINO, K. A major gene for low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 136, n.1, p. 63-68, 2004.
- LYONS, J.M. Chilling injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Plo Alto, v. 24, p. 445-466, 1973.

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

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

MIEDEMA, P. The effects of low temperatures on *Zea mays*. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.35, p.93-128, 1982.

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

MORISHIMA, H. Evolution and domestication on rice. In: International Rice Genetics Symposium, 4, 2001, Los Bãnos, Proceedings...Los Bãnos: **International Rice Research Institute**, p.63-67, 2001.

NEDEL, J.L.; SCHUCH, L.O.B.; ASSIS, F.N.; CARMONA, P.S. **Produção de arroz irrigado**, A planta de arroz: morfologia e fisiologia - 3.ed. ver. e ampl. Pelotas: ed. Universitária, Universidade Federal de Pelotas, p. 18-62, 2004.

REDOÑA, E.D. MACKILL, D.J. Genetic variation for seedling vigor traits in rice. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 2, p. 285-290, 1996.

SAS Institute. **System for Information**. Versão 8.0. Cary 3 CD, 2000.

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

5. CAPÍTULO III

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA AO FRIO NO ESTÁDIO DE GERMINAÇÃO DO ARROZ

5.1 Introdução

A ocorrência de baixas temperaturas durante a fase reprodutiva do arroz provoca danos ao produtor. O problema abrange o Estado do Rio Grande do Sul, e em várias regiões as temperaturas são inferiores a 15°C durante a noite, em épocas que coincidem com o estágio reprodutivo do arroz (OLIVEIRA, 1997).

Uma estratégia para evitar o frio no período reprodutivo é antecipar a semeadura, entretanto, isto pode resultar em perdas durante os primeiros estágios de germinação, pois o solo ainda continua frio. Acredita-se que a seleção de cultivares tolerantes a baixas temperaturas no período germinativo pode solucionar este problema, entretanto, a seleção de genótipos portadores desta tolerância é tarefa bastante complexa (CRUZ; MILLACH, 2000).

Modernamente, tem-se admitido que o uso de marcadores moleculares pode auxiliar na identificação da variabilidade genética e de genes de importância para a seleção de cultivares que atendam necessidades específicas, como a tolerância a estresses bióticos, e, desta forma, reduzir o tempo e os custos financeiros durante a seleção. Estes métodos integram o melhoramento convencional e estudos em genômica e têm sido denominados como “melhoramento assistido por marcadores”. No contexto da seleção assistida, a primeira fase dos trabalhos, são aquelas destinadas a identificar genes e/ou marcadores moleculares associados a característica que se deseja melhorar.

A tecnologia do RNAseq, tem sido muito utilizada recentemente, permitindo caracterizar transcriptomas, através do sequenciamento total do conteúdo de RNAs numa determinada condição e/ou tempo. O uso do RNAseq tem gerado uma grande quantidade de dados de diferenças entre alelos, tais como diferenças em regiões 3'UTRs/5'UTRs, CDSs, em regiões de *splicing* e SNPs (TRAPNELL et al., 2010), possibilitando identificar genes expressos em resposta a diferentes condições de tratamento num genótipo e entre diferentes genótipos avaliados numa mesma condição. Em específico neste estudo, foi conduzido um experimento de comparação de duas cultivares (sensível vs. tolerante) para identificar quais genes são diferencialmente expressos em resposta ao frio.

O objetivo do presente estudo foi, fazer a prospecção de marcadores moleculares destinados a seleção assistida para tolerância ao frio no estágio de germinação do arroz, baseado na identificação de genes diferencialmente expressos no transcriptoma do arroz via RNAseq.

5.2 Material e Métodos

Para o experimento foram utilizadas as cultivares BRS SCS Tio Taka (subespécie *indica* - sensível ao frio na germinação) e Oro (subespécie *japonica* - tolerante ao frio na germinação).

Sementes dos dois genótipos foram colocadas para germinar em *gerbox* em câmara de crescimento do tipo BOD, com fotoperíodo de 16 horas. Para o tratamento “controle” ambos os genótipos foram mantidos com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (câmara 1) e, as plântulas mantidas até o período S3 (ponto de agulha) (COUNCE et. al., 2000). No tratamento “frio” os genótipos foram mantidos nas mesmas condições, entretanto, com temperatura de $13\pm 2^{\circ}\text{C}$ (CRUZ; MILLACH, 2004) até o período S3 (câmara 2). O delineamento experimental foi completamente ao acaso, com três repetições por tratamento, onde cada repetição foi constituída por um *gerbox* contendo 50 sementes, sendo cada *gerbox* a unidade experimental.

Ao atingirem o estágio S3 tecidos foliares do *bulk* de 50 plântulas (*gerbox*) foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em

ultrafreezer à -80°C para posterior extração de RNA e análises. As plântulas controle foram coletadas no mesmo estágio que as plântulas estressadas (frio) (estádio S3).

Preparo do cDNA e sequenciamento

O RNA total foi extraído, a partir de 100 mg da parte aérea da plântula (*bulk* de 50 plântulas), utilizando Plant RNA Reagent Purelink® (Invitrogen™). Sua integridade e qualidade foi verificada por espectrofotômetro NanoDrop ND-1000® (GE Healthcare™) e a eletroforese realizada em gel de agarose 1%. As bibliotecas foram preparadas por meio do kit TruSeq RNA Sample Preparation® V 2 (Illumina™), segundo recomendações do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi avaliada com o equipamento Agilent 2100 BioAnalyzer® (Agilent Technologies™) utilizando o kit Agilent DNA 1000® (Agilent™). O sequenciamento das bibliotecas foi do tipo *paired-end* 2x100pb realizado na plataforma HiSeq 2500® (Illumina™), conforme metodologia utilizada por Amaral (2014).

A partir da extração e avaliação da integridade e qualidade do RNA extraído das três repetições, foram escolhidas duas repetições com melhor qualidade de RNA para realizar o sequenciamento.

Análise dos *reads* e identificação de genes diferencialmente expressos

Para a análise e visualização da qualidade dos *reads*, foi utilizado o programa FastQC. Após, o programa Trimmomatic Ver. 0.32 (BOLGER et al., 2014) foi utilizado para a remoção das bases com baixa qualidade e dos adaptadores de cada biblioteca. Os parâmetros para essa etapa foram: PE, indicando que as sequências estão no formato *paired-end*; ILLUMINACLIP para retirar as possíveis sequências de adaptadores; SLIDINGWINDOW:4:25, para retirar as bases de qualidade inferior a 25 dentro de uma janela de 4 bases; LEADING:10 e TRAILING:10, para retirar bases com qualidade inferior a 10, de ambos os lados dos *reads*; e MINLEN:90, para manter os *reads* com o mínimo de 90 bases, descartando os que apresentaram tamanho inferior a isto após a limpeza (AMARAL, 2014).

Os *reads* foram mapeadas contra o genoma de referência de *Oryza sativa* cv. Nipponbare (IRGSP build 1.0-RAP-DB) conforme descrito por Trapnell et al., (2012): na primeira fase os programas TopHat Ver. 2.0.11 (TRAPNELL et al., 2009) e Bowtie Ver. 0.12.7 (LANGMEADET al., 2009) foram utilizados para o mapeamento dos *reads* na pseudomolécula do genoma do arroz (obtida em <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>), na segunda fase os resultados foram usados pelo programa Cufflinks (TRAPNELL et al., 2010) para detectar quais *locos* mapeados pertencem a genes conhecidos ou regiões genômicas não anotadas (KYNDT et al., 2012; AMARAL, 2014). Para a contagem do número de *reads* de cada amostra foi utilizado o programa HTseq Ver. 0.5.3 (ANDERS et al., 2015).

A identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada utilizando o programa R v3.1.0 (R Core Development Team) com o pacotes edgeR (ROBINSON et al., 2008), cummRbund (TRAPNELL et al., 2012) e DEseq (ANDERS et al., 2013) obtidos do repositório Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004). Os níveis de expressão foram normalizados pelo método FPKM (*Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped*), sendo considerados diferencialmente expressos os genes com valores de $p < 0,01$ pelo teste exato de Fisher.

O software MapMan (THIMM et al., 2004) foi utilizado para visualizar mudanças gerais no metabolismo relacionadas aos estresses. Para obtenção de gráficos e demais análises foi utilizado o programa Microsoft Excel.

5.3 Resultados e discussão

Na Figura 1, é mostrada a relação entre amostras e tratamentos utilizando escalonamento *multidimensional* (MDS), gerados pelo programa edgeR. Este procedimento avalia o padrão geral de todos os transcritos em todas as amostras e tratamentos, indicando a confiabilidade dos resultados, pois as repetições de cada tratamento (Oro-controle, Oro-Frio, Tio Taka-controle e Tio Taka-frio) permaneceram próximas, indicando repetitividade das amostras. Os dados também indicam que a cultivar tolerante Oro sofreu menor mudança nos padrões de expressão do que a cultivar sensível Tio Taka, pois as amostras “Oro-

controle” e “Oro-frio” ficaram mais próximas entre si que os dois tratamentos da cultivar sensível Tio Taka.

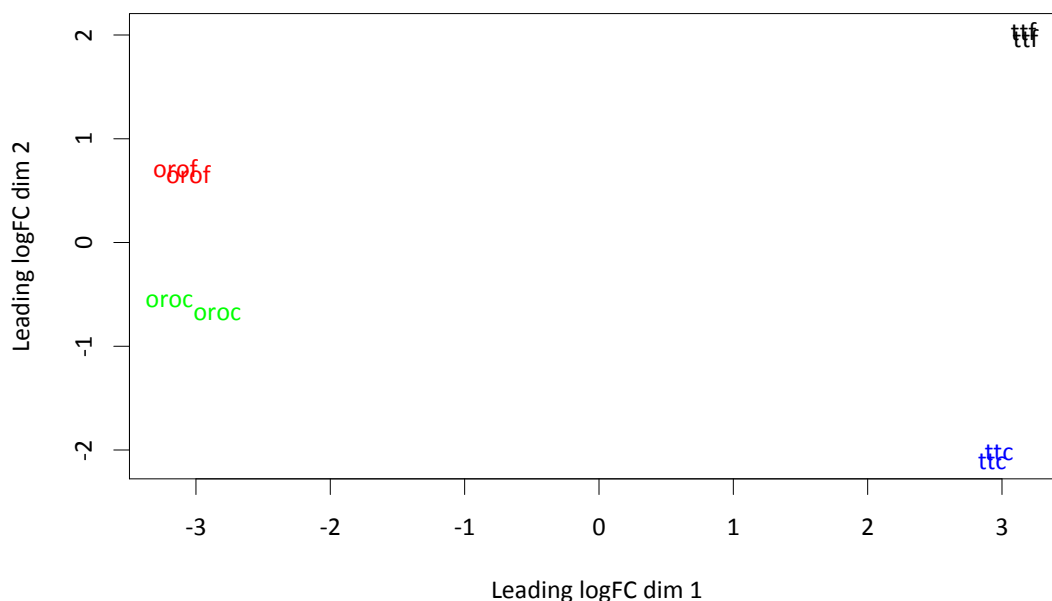


Figura 1. PlotMDS, indicando a dispersão dos tratamentos e repetições, em função do padrão geral de expressão gênica de cada amostra.

Na Figura 2, foi utilizada uma segunda metodologia para avaliar os resultados da expressão gênica nos diferentes tratamentos e suas repetições, neste caso, a relação das amostras foi obtida através da distância euclidiana e representação em *heatmap* e dendograma. Estes resultados confirmam aqueles obtidos na Figura 1.

Nos dados mostrados na Figura 3, é possível verificar que na cultivar tolerante Oro o padrão geral da expressão dos genes nas condições controle e estresse por frio são muito parecidos, enquanto a distribuição normal dos dados na cultivar sensível ao frio Tio Taka são mais diferentes. Esses resultados indicam que na cultivar Tio Taka ocorreu uma maior mudança na expressão gênica em relação a cultivar Oro.

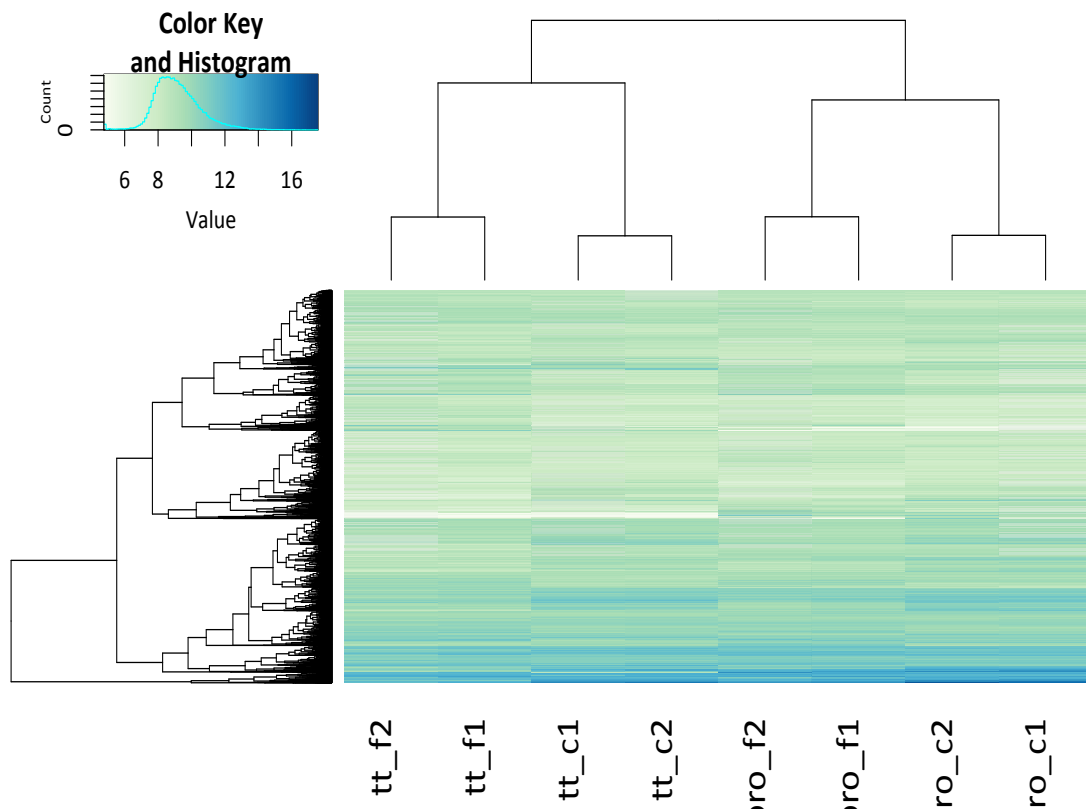


Figura 2. *HeatMap*, distância entre as amostras em função de seus padrões gerais de expressão gênica.

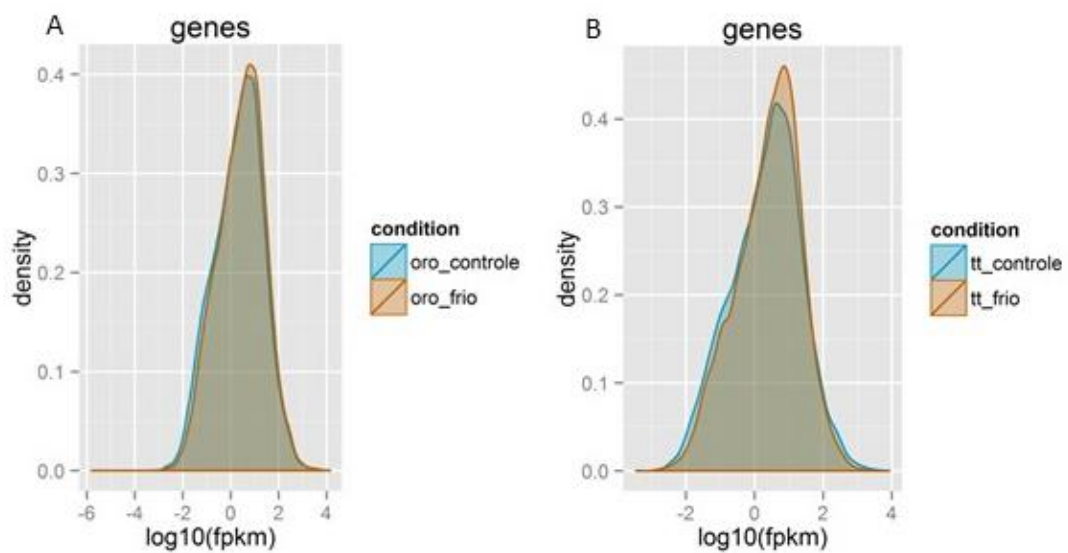


Figura 3. Distribuição normal dos dados de expressão gênica nos diferentes tratamentos. A) Cultivar tolerante Oro; B) Cultivar sensível Tio Taka.

Na Figura 4, é mostrada a dispersão dos valores de expressão gênica (FPKM) sendo os eixos x e y a expressão na condição controle e frio, respectivamente. Para o genótipo Oro na figura 4A, onde são mostrados todos os genes, o valor do coeficiente de determinação em relação a regressão foi de 0,96, resultando numa correlação dos valores de expressão entre controle e frio igual a 0,97. Na figura 4B, onde são mostrados somente os 384 genes, com diferença significativa na expressão, ocorreu acentuado aumento nos valores da expressão na condição de estresse, com redução na correlação entre os valores de expressão nas duas condições para 0,87. Também é possível ver nestas figuras que aqueles genes com valores de expressão diferencial significativa não foram aqueles com altos valores de expressão (acima de 100 FPKM no controle) em condições normais de germinação.

A dispersão dos dados no genótipo sensível Tio Taka é mostrada nas figuras 4C e 4D, mostrando uma tendência de formação de dois grupos de genes, um grupo menor próximo ao eixo y e um grande número de genes próximo ao eixo x. De maneira geral a maioria dos genes são de expressão mais elevada na condição controle e pouco aumento na expressão em resposta ao frio.

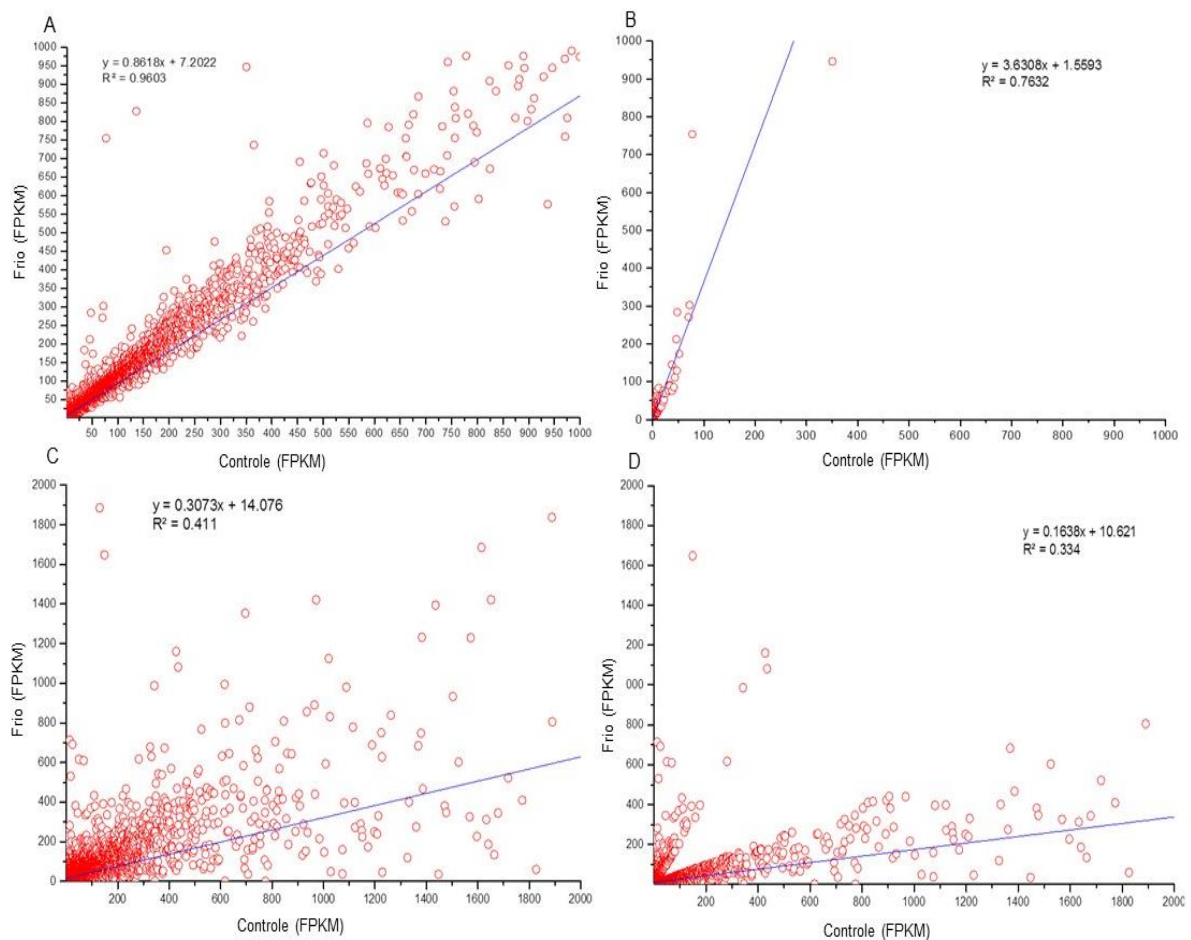


Figura 4. Regressão linear entre valores de expressão (FPKM) na condição de estresse por frio vs. Controle: A) Cultivar tolerante Oro, regressão entre todos os genes; B) Cultivar tolerante Oro, regressão entre genes com expressão diferencial significativa; C) Cultivar sensível Tio Taka, regressão entre todos os genes; D) Cultivar sensível Tio Taka, regressão entre genes com expressão diferencial significativa.

Na figura 5, é possível verificar que o padrão de genes com diferença significativa na expressão é diferente nos dois genótipos, pois, na figura 5A existe uma tendência de ocorrência de genes com menores valores de contagem de *reads* por milhão (eixo x) com diferença significativa. Numa visão geral, existe uma relação dos genes com maior número de contagem de *reads* com significância na expressão diferencial.

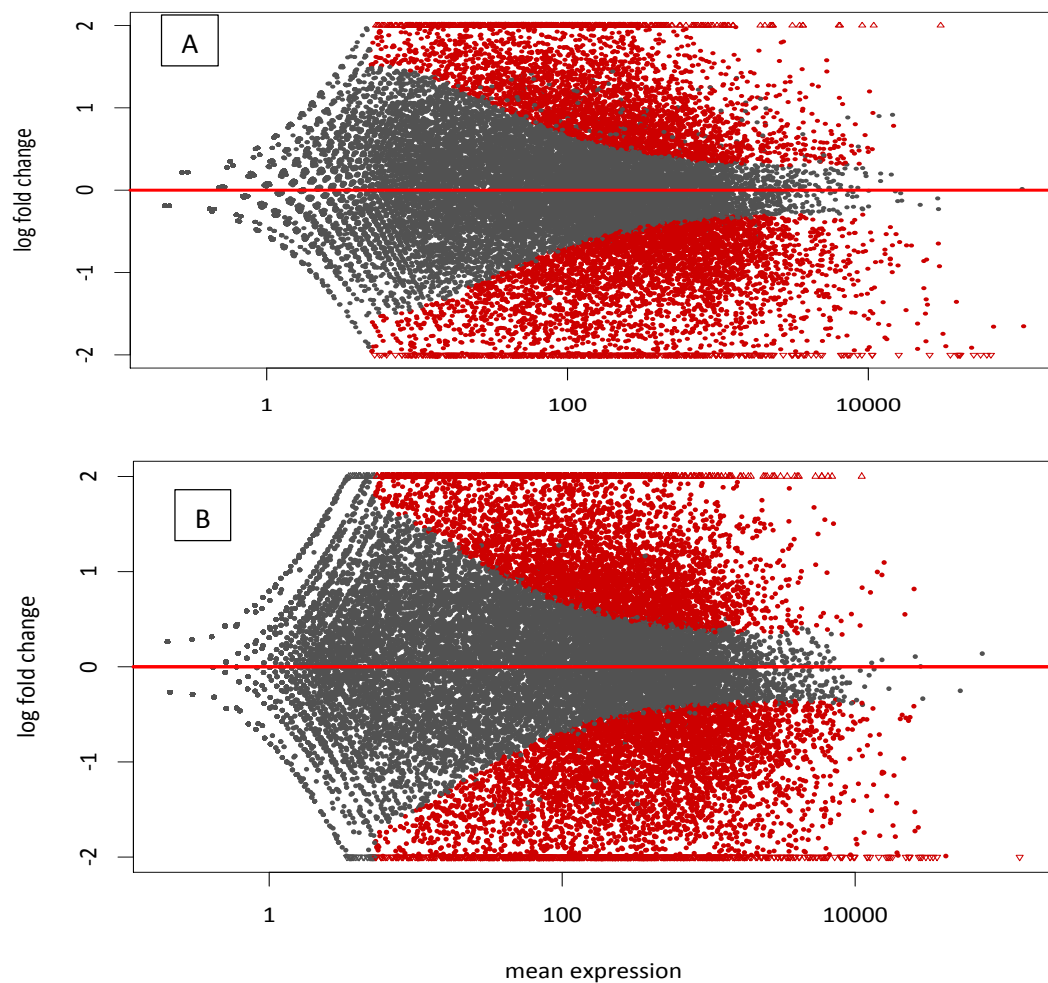


Figura 5. Distribuição dos valores de mudança na expressão (Log2FC) vs. contagem no número de leitura (*counts per million*). Pontos em cinza são genes com expressão diferencial não significativa e vermelha com expressão diferencial significativa. A) Cultivar tolerante Oro e B) Cultivar sensível Tio Taka.

Na figura 6 são mostrados os pontos do metabolismo onde ocorreram mudanças significativas de expressão, sendo 8970 genes com expressão diferencial significativa na cultivar sensível Tio Taka e 384 na cultivar tolerante Oro. É possível verificar que no genótipo sensível ao frio (Tio Taka – figura 6B) ocorreu uma grande alteração no metabolismo geral, pois existem mudanças de expressão de genes (*down* e *up-regulated*) no metabolismo de; parede celular, síntese de lipídeos, metabolismo do amido, fermentação, ascorbato/glutathione, fotorrespiração, reações de luz, síntese de aminoácidos, metabolismo de nucleotídeos e metabolismo secundário. No genótipo tolerante (Oro- figura 6A) as mudanças não são evidentes nesta imagem.

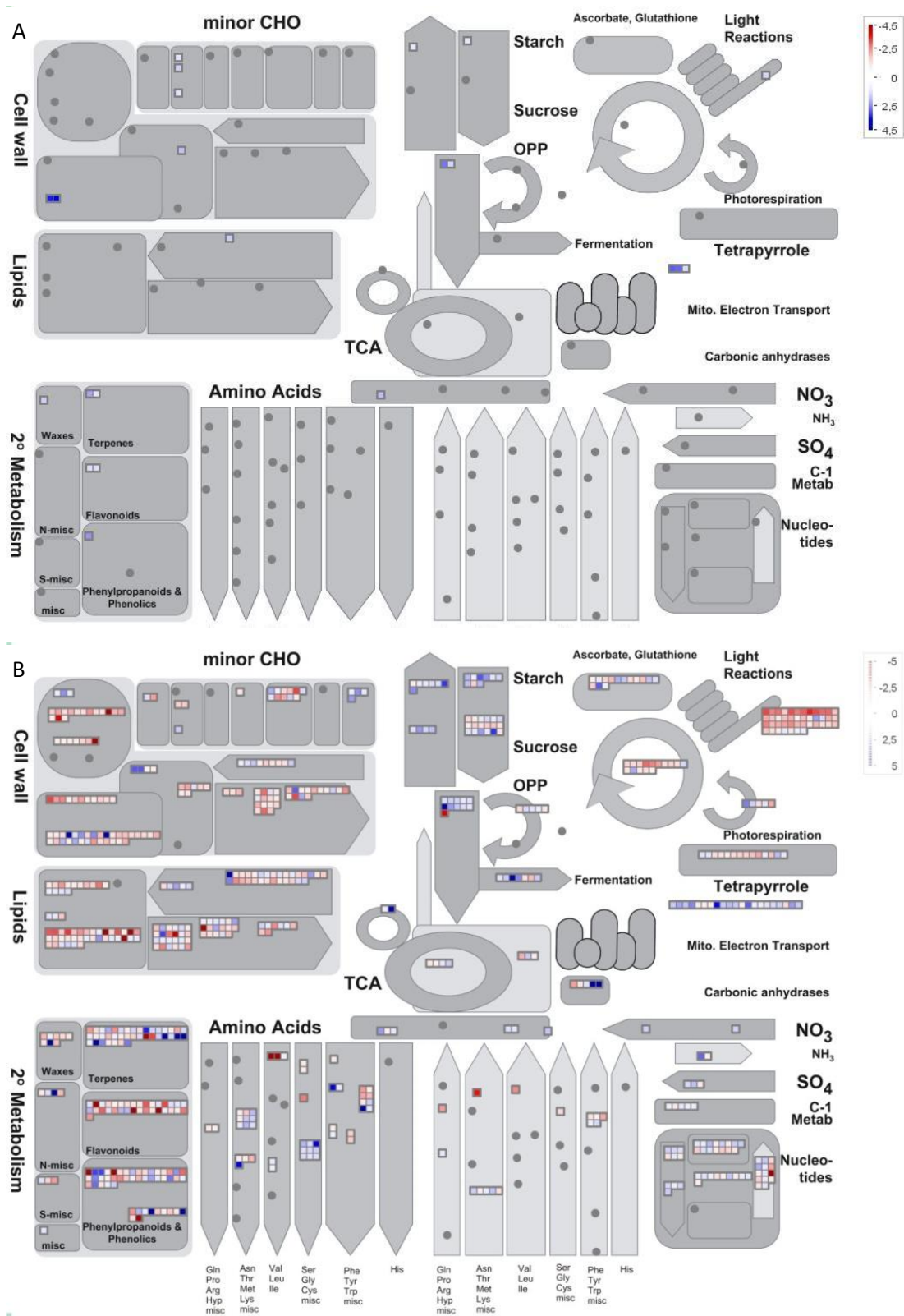


Figura 6. Gráfico da “Visão geral do metabolismo” gerada pelo programa *MapMan*. Azul significa pontos do metabolismo com aumento na expressão e vermelho redução na expressão. A) Cultivar tolerante Oro e B) Cultivar sensível Tio Taka.

Na figura 7, é possível verificar que na cultivar tolerante (figura 7A), a maioria dos 384 genes com expressão diferencial significativa, sofreram um aumento na expressão (*up-regulated*), evidenciando que os principais metabolismos alterados foram: reparo de DNA, síntese de DNA, transporte vesicular e endereçamento proteico, metabolismo do estresse (biótico e abiótico), regulação da transcrição, síntese e ativação de aminoácidos, desenvolvimento, hormônios, modificação e degradação de proteínas, transporte e genes com função desconhecida.

Na figura 8 são mostrados grupos de genes/proteínas já conhecidos como relacionados as respostas em condições de estresse biótico e abiótico. É possível verificar no genótipo tolerante Oro (figura 8A) os grupos de genes de; fitohormônios (etileno, ácido salicílico, jasmonato), parede celular, sinalização (ERF, WRKY, MYB), proteínas de choque térmico e metabolismo secundário. Diferentemente da figura 8B (Tio Taka), é possível ver que na cultivar tolerante Oro, genes associados ao metabolismo do ABA, brassinosteroides, auxinas, MAPK e bZip não sofreram alterações na expressão. Geralmente estes genes são importantes para sinalização durante as mudanças no metabolismo durante as situações de estresse nas plantas, mas neste caso, é possível que a não sinalização destas rotas estejam associadas ao controle da tolerância na cultivar Oro.

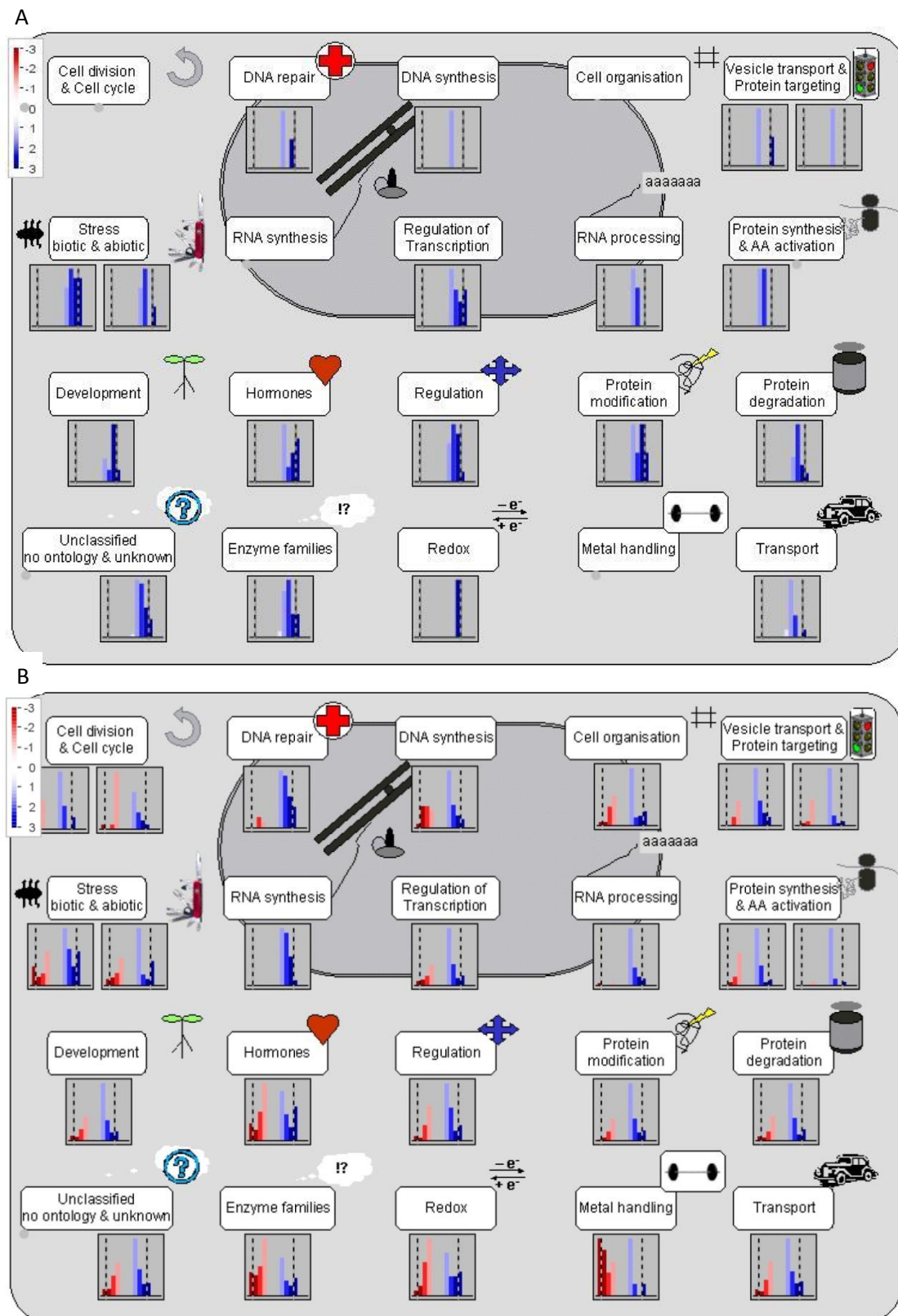


Figura 7. Gráfico das funções celulares gerada pelo programa *MapMan*. Azul significa pontos do metabolismo com aumento na expressão e vermelho redução na expressão. A) Cultivar tolerante Oro e B) Cultivar sensível Tio Taka.

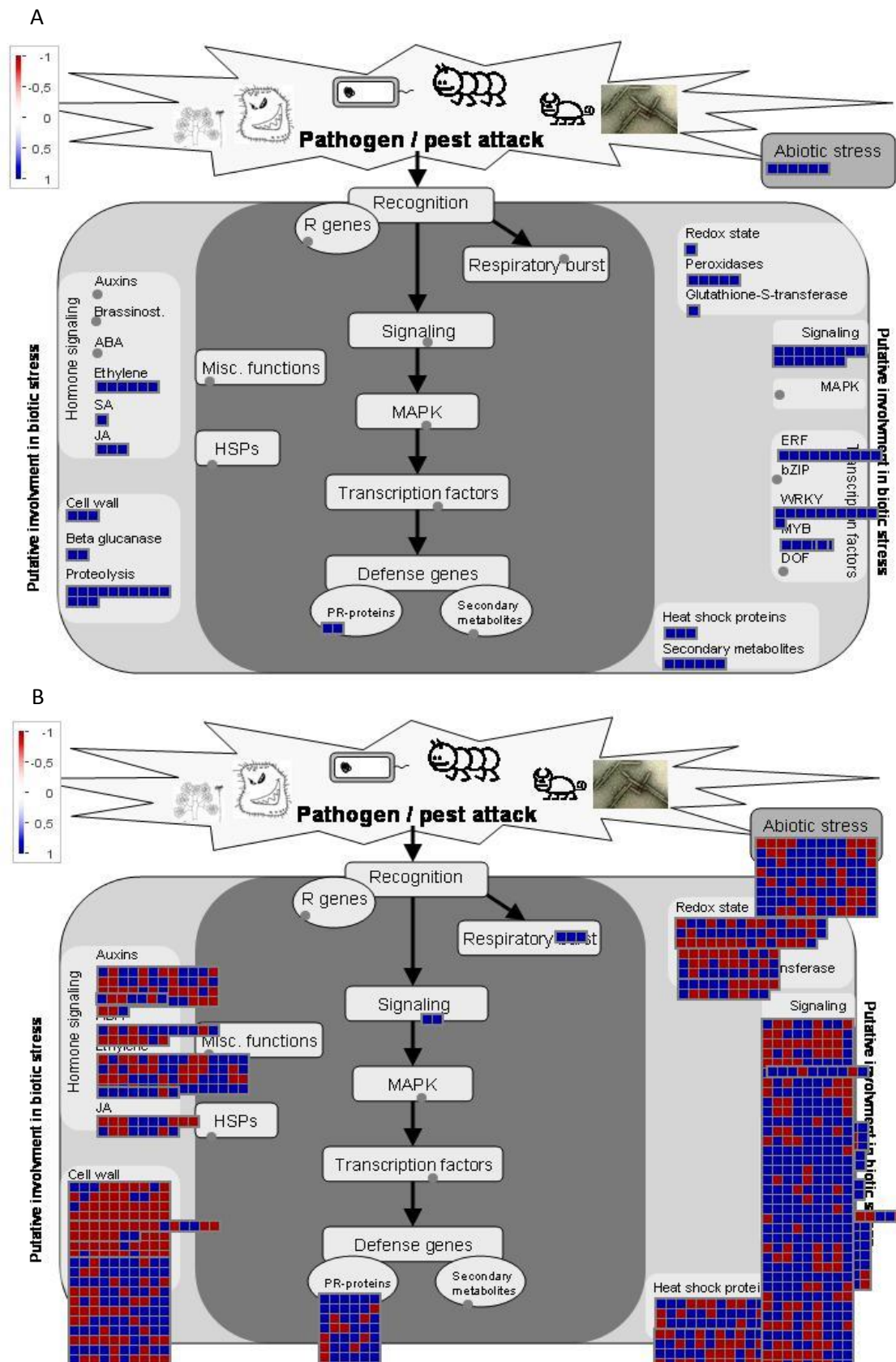


Figura 8. Gráfico dos genes/proteínas conhecidas como associadas a estresse abiótico, gerada pelo programa MapMan. Azul significa pontos do metabolismo com aumento na expressão e vermelho redução na expressão. A) Cultivar tolerante Oro e B) Cultivar sensível Tio Taka.

Na figura 9, são mostrados os totais de genes com expressão diferencial significativa em cada genótipo. As cultivares Oro e Tio taka tiveram um total de 384 e 8.970 genes diferencialmente expressos, respectivamente, e que 235 genes foram diferencialmente expressos em comum entre as duas cultivares.

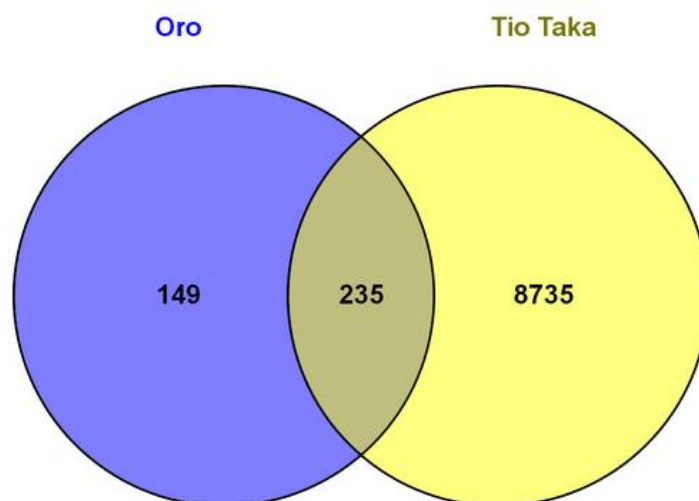


Figura 9. Diagrama de Venn. Em azul genes diferencialmente expressos (únicos) no genótipo Oro, em amarelo genes diferencialmente expressos (únicos) em Tio taka e cinza genes diferencialmente expressos comuns aos dois genótipos.

Na figura 10, são plotados os valores de expressão diferencial ($\log_2FC$) dos 149 genes únicos da cultivar Oro, ordenados pelo valor de $\log_2FC$. É possível verificar que a maioria desses genes tem baixos valores de FC.

Considerando que esses genes, com expressão diferencial significativa, em resposta ao frio e únicos da cultivar tolerante, podem ser genes de importância no entendimento de quais genes são responsáveis pela tolerância, foram selecionados 17 genes com melhores valores de FPKM e FC, mostrados na figura 11 (tabela 1), sendo que destes, 6 genes tem sua função desconhecida.

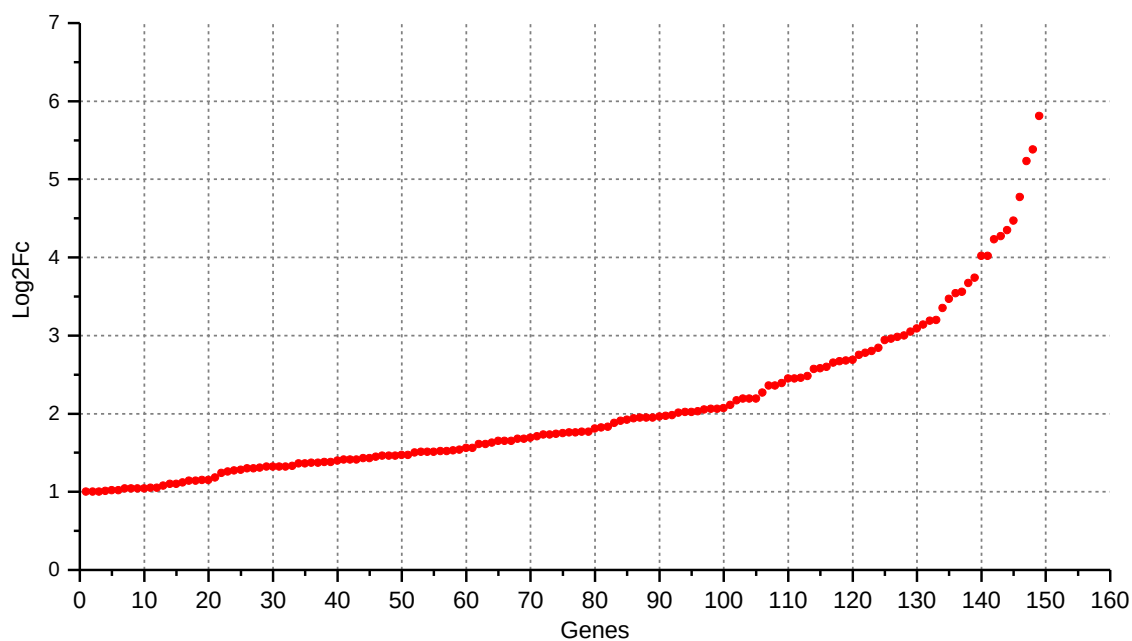


Figura 10. Valores de expressão (FPKM) dos 149 genes diferencialmente expressos presentes na cultivar tolerante Oro.

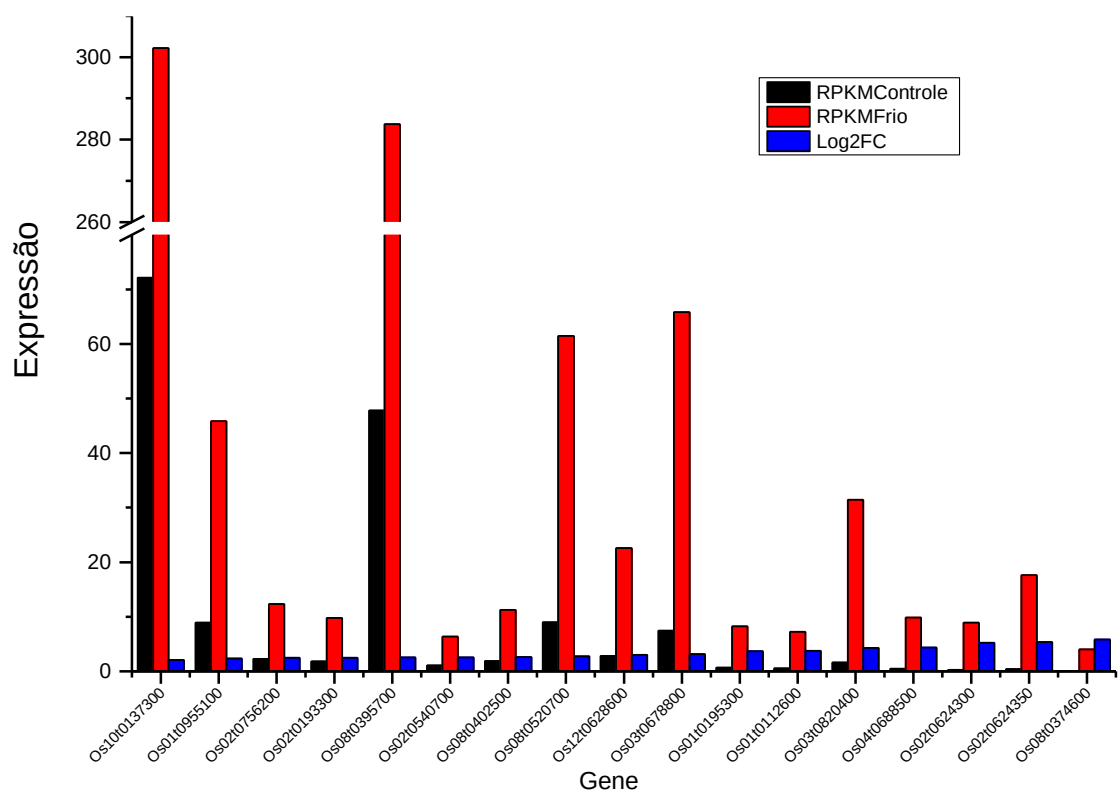


Figura 11. Seleção de genes com maior diferença de expressão (controle/frio) entre os 149 genes únicos da cultivar tolerante Oro.

Tabela 1. Lista de genes diferencialmente expressos, selecionados na cultivar tolerante Oro.

Gene/Loco	Descrição	FPKM	FPKM	Log2FC
		controle	frio	
Os10t0137300	Similar to BLN1-1	72.11	302.20	2.07
Os01t0955100	Similar to Calmodulin-like protein (Fragment).	8.94	45.87	2.36
Os02t0756200	Similar to Phi-1-like phosphate-induced protein.	2.26	12.36	2.45
Os02t0193300	Conserved hypothetical protein.	1.78	9.82	2.46
Os08t0395700	Conserved hypothetical protein.	47.79	283.75	2.57
Os02t0540700	Similar to Arm repeat-containing protein.	1.06	6.35	2.58
Os08t0402500	Protein of unknown function DUF761	1.86	11.28	2.60
Os08t0520700	Hypothetical protein.	8.98	61.49	2.78
Os12t0628600	Similar to Thaumatin-like pathogenesis-related	2.82	22.60	3.00
Os03t0678800	Glycosyl transferase, family 8 protein.	7.47	65.82	3.14
Os01t0195300	Hypothetical conserved gene.	0.65	8.25	3.67
Os01t0112600	Conserved hypothetical protein.	0.54	7.22	3.74
Os03t0820400	Similar to ZPT2-13.	1.63	31.44	4.27
Os04t0688500	Peroxidase (EC 1.11.1.7).	0.48	9.84	4.35
Os02t0624300	Similar to Y19 protein.	0.24	8.90	5.23
Os02t0624350	Hypothetical protein.	0.42	17.66	5.38
Os08t0374600	Similar to Receptor kinase-like protein.	0.07	4.03	5.81

Na Figura 12, são plotados os valores de Log2Fc dos 235 genes diferencialmente expressos e significativos, comuns as duas cultivares, sendo os dados ordenados pelo valor de FC na cultivar Oro. Deste total de genes foram selecionados dois grupos de genes: Seleção 1) genes *dow-regulated* em Tio Taka e *up-regulated* em Oro, e, Seleção 2) genes com aumento de expressão em Tio Taka e Oro, mas com maior expressão em Tio Taka (mostrados na figura 13).

Os genes da seleção 1 (*dow-regulated* Tio Taka/*up-regulated*Oro) possivelmente tenham relação com a tolerância da cultivar Oro, pois os mesmos sofrem redução na expressão na cultivar sensível em resposta ao estresse e contrariamente tem aumento na expressão na cultivar tolerante durante o estresse, o que pode indicar a associação destes com a tolerância.

Aqueles genes, da seleção 2, também tem um padrão importante de resposta, entretanto, diferente dos genes da seleção 1, estes genes podem ter efeito negativo na tolerância, pois eles tem uma maior taxa de expressão na

cultivar sensível em resposta ao estresse. Estes genes tem um aumento de expressão inferior na cultivar tolerante Oro, desta forma, esse reduzido aumento na expressão pode ter efeito positivo na tolerância.

Para todos os genes, selecionados na tabela 1 (diferencialmente expressos na cultivar Oro), tabela 2 (seleção 1) e tabela 3 (seleção 2) deverão ser feitos experimentos futuros com populações segregantes e/ou um número maior de cultivares sensíveis/tolerantes para confirmação da associação desses genes com a tolerância ao frio.

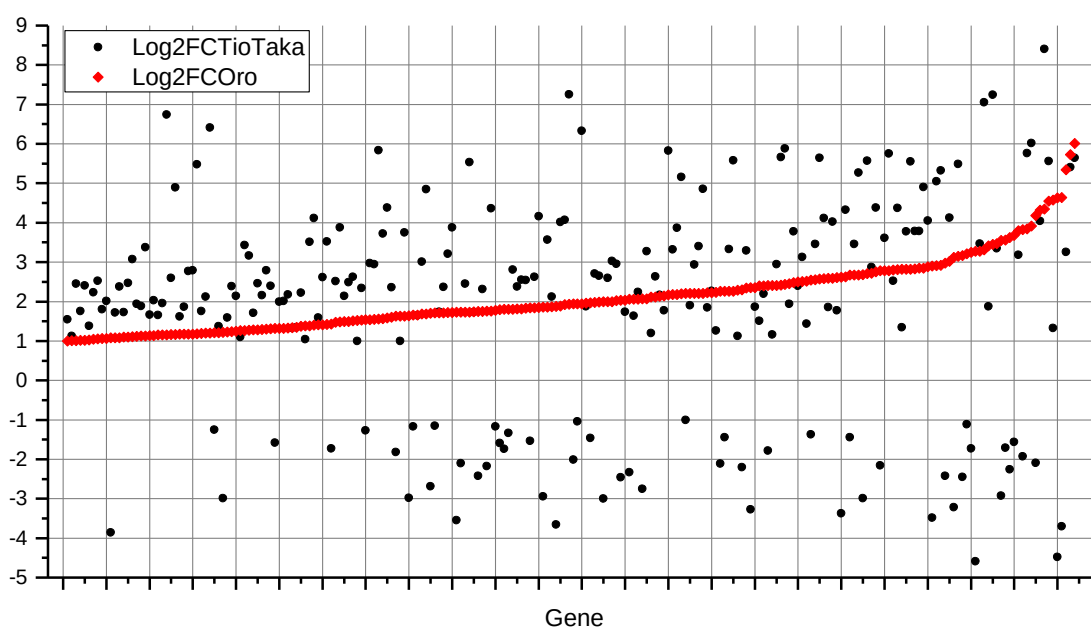


Figura 12. Genes diferencialmente expressos (controle/frio) nas cultivares Tio Taka-sensível (preto) e Oro-tolerante (vermelho). Dados ordenados pelos valores Log2FC da cultivar Oro.

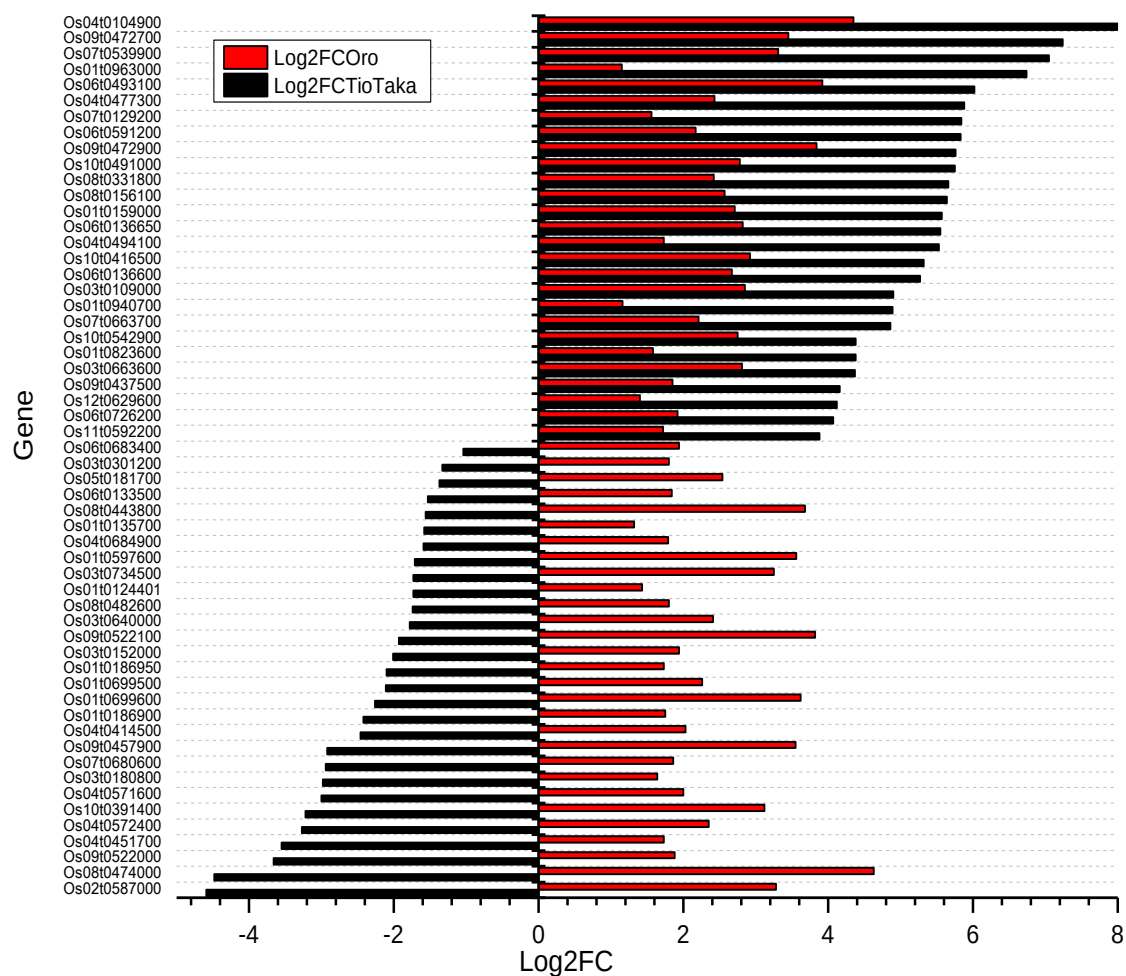


Figura 13. Seleção das maiores diferenças de expressão (controle/frio) entre os 235 genes diferencialmente expressos em comum nas cultivares Tio Taka e Oro.

Tabela 2. Lista de genes diferencialmente expressos (seleção 1), genes *down-regulated* na cultivar sensível Tio Taka e *up-regulated* na cultivar tolerante Oro.

Gene/loco		Log2FC TioTaka	Log2FC Oro
Os02t0587000	Similar to Glycine rich protein (Fragment).	-4.59	3.28
Os08t0474000	Similar to AP2 domain containing protein RAP2.6 (Fragment).	-4.48	4.63
Os09t0522000	Similar to Dehydration-responsive element-binding protein 1B.	-3.66	1.88
Os04t0451700	Conserved hypothetical protein.	-3.55	1.73
Os04t0572400	Similar to CRT/DRE binding factor 1.	-3.27	2.35
Os10t0391400	Tify domain containing protein.	-3.22	3.12
Os04t0571600	Multi antimicrobial extrusion protein MatE family protein.	-3.00	2.00
Os03t0180800	Similar to ZIM motif family protein.	-2.98	1.64

Os07t0680600	Protein of unknown function DUF3133 domain containing protein.	-2.94	1.86
Os09t0457900	Similar to AP2 domain containing protein RAP2.6 (Fragment).	-2.92	3.55
Os04t0414500	Similar to H0622F05.2 protein.	-2.46	2.03
Os01t0186900	Similar to cDNA clone:001-117-G12, full insert sequence.	-2.42	1.75
Os01t0699600	Serine/threonine protein kinase domain containing protein.	-2.26	3.62
Os01t0699500	Serine/threonine protein kinase domain containing protein.	-2.11	2.26
Os01t0186950	Hypothetical protein.	-2.10	1.73
Os03t0152000	Heavy metal transport/detoxification protein protein.	-2.01	1.94
Os09t0522100	Similar to Dehydration-responsive element-binding protein 1H.	-1.93	3.82
Os03t0640000	Patatin Family protein.	-1.78	2.41
Os08t0482600	Cupredoxin domain containing protein.	-1.74	1.80
Os01t0124401	Similar to Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor.	-1.73	1.43
Os03t0734500	Conserved hypothetical protein.	-1.73	3.25
Os01t0597600	Amino acid transporter, transmembrane domain containing protein.	-1.71	3.56
Os04t0684900	Ribonuclease CAF1 family protein.	-1.59	1.79
Os01t0135700	EF-HAND 2 domain containing protein.	-1.58	1.32
Os08t0443800	Tetraspanin domain containing protein.	-1.56	3.68
Os06t0133500	Conserved hypothetical protein.	-1.53	1.84
Os05t0181700	Conserved hypothetical protein.	-1.37	2.54
Os03t0301200	COBRA-likeprotein7 precursor.	-1.33	1.80
Os06t0683400	Similar to EF-hand Ca ²⁺ -binding protein CCD1.	-1.04	1.94

Tabela 3. Lista de genes diferencialmente expressos (seleção 2), genes com aumento de expressão nas cultivares Tio Taka e Oro, mas com maior expressão na cultivar sensível Tio Taka.

		Log2FC	Log2FC
Gene/loco		TioTaka	Oro
Os11t0592200	Similar to Chitin-binding allergen Bra r 2 (Fragments).	3.88	1.72
Os06t0726200	Similar to Chitinase 1.	4.07	1.92
Os12t0629600	Thaumatococcus-like protein.	4.12	1.40

Os09t0437500	Dormancy auxin associated Family protein.	4.16	1.85
Os03t0663600	Similar to Pathogenesis-related thaumatin-like protein.	4.37	2.81
Os01t0823600	Conserved hypothetical protein.	4.38	1.58
Os10t0542900	Similar to chitinase.	4.38	2.75
Os07t0663700	Similar to Oxidoreductase protein	4.86	2.21
Os01t0940700	Similar to Glucan endo-1,3-beta-glucosidase endoglucanase GII).	4.89	1.16
Os03t0109000	Similar to NAC domain protein.	4.90	2.85
Os06t0136600	Similar to Enolase 1 (EC 4.2.1.11) dehydratase 1)	5.27	2.67
Os10t0416500	(TBC-1).	5.32	2.92
Os04t0494100	Similar to Chitinase.	5.53	1.73
Os06t0136650	Non-protein coding transcript.	5.55	2.82
Os01t0159000	Similar to cDNA clone:J023049H21, full insert sequence.	5.57	2.71
Os08t0156100	Conserved hypothetical protein.	5.64	2.57
Os08t0331800	Conserved hypothetical protein.	5.66	2.42
Os10t0491000	Plant Basic Secretory Protein family protein.	5.75	2.78
Os09t0472900	Similar to Blight-associated protein p12 precursor.	5.76	3.84
Os06t0591200	Conserved hypothetical protein.	5.83	2.17
Os07t0129200	Similar to Pathogenesis-related protein PR1a.	5.84	1.56
Os04t0477300	Similar to OSIGBa0116M22.6 protein.	5.88	2.43
Os06t0493100	Conserved hypothetical protein.	6.02	3.92
Os01t0963000	Similar to Peroxidase BP 1 precursor.	6.74	1.15
Os07t0539900	Similar to Beta-1,3-glucanase-like protein.	7.05	3.31
Os09t0472700	Similar to blight-associated protein p12.	7.24	3.45
Os04t0104900	Similar to O-methyltransferase (EC 2.1.1.6) (Fragment).	8.41	4.35

5.4 Conclusão

Os resultados indicam que existe uma grande complexidade nas mudanças dos padrões de expressão gênica no genótipo sensível ao frio, pois, no transcriptoma desta cultivar ocorreu mudança na expressão de genes em várias fases do metabolismo.

Diferentemente do que aconteceu na cultivar sensível ao frio, na cultivar tolerante (Oro) poucos genes tiveram expressão gênica aumentada significativamente.

Uma lista de 55 genes com diferença na expressão comuns as duas cultivares e uma lista com 17 genes com diferença na expressão únicos para a cultivar tolerante Oro, foram selecionados para futuros trabalhos de validação da associação das diferentes respostas desses genes à tolerância ao frio na germinação de arroz.

5.5 Referências Bibliográficas

- AMARAL, Marcelo Nogueira do. **Análise do transcriptoma e trocas gasosas em plantas de arroz sob estresses abióticos**. 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
- ANDERS, S.; MCCARTHY, D.J.; CHEN, Y.; OKONIEWSKI, M.; SMYTH, G.K.; HUBER, W.; ROBINSON, M.D. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. **Nature Protocols**, 8, Aug, p.1765-1786, 2013.
- ANDERS, S.; PYL, P.T.; HUBER, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**. v. 31, nº2, p. 166-169, 2015.
- BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2114-2120, 2014.
- COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 436-443, 2000.
- CRUZ, R. P.; 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.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Cold tolerance at the germination stage of rice: methods of evaluation and characterization of genotypes. **Scientia Agricola**, v. 61, n.1, p.1-8, 2004.

GENTLEMAN, R.C.; CAREY, V.J.; BATES, D.M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A.J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J.Y.H.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v.5:R80, 2004.

KYNDT, T.; DENIL, S.; HAEGEMAN, A.; TROOSKENS, G.; DE MEYER, T.; VAN CRIEKINGE, W.; GHEYSEN, G. Transcriptome analysis of rice mature root tissue and root tips in early development by massive parallel sequencing. **Journal of Experimental Botany**, v.63, nº5, p.2141-2157, 2012.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v.10:R25, 2009.

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

R Core Development Team. R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**: Vienna; 2014.

ROBINSON, M.D.; MCCARTHY, D.J.; SMYTH, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, nº1, p. 139-140, 2008.

THIMM, O.; BLÄSING, O.; GIBON, Y.; NAGEL, A.; MEYER, S.; KRÜGER, P.; SELBIG, J.; MÜLLER, L.A.; RHEE, S.Y.; STITT, M. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, v. 37, p. 914-939, 2004.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, nº9, p.1105-1111, 2009.

TRAPNELL, C.; ROBERTS, A.; GOFF, L.; PERTEA, G.; KIM, D.; KELLEY, D.R.; PIMENTEL, H.; SALZBERG, S.L.; RINN, J.L.; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**, v. 7, nº3, p. 562-578, 2012.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B.A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M.J.; SALZBERG, S.L.; WOLD, B.J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, v. 28, nº5, p. 511-515, 2010.

6. Considerações finais

Para o melhoramento genético de um caráter é fundamental a existência de variabilidade, sendo que a identificação de variabilidade é um dos primeiros passos para o início de um programa de melhoramento visando à obtenção de genótipos superiores. Para o arroz, essa pode ser incrementada por meio da introdução de germoplasma, através de cruzamentos entre cultivares da subespécie *indica ejapônica*, através da avaliação do germoplasma disponível no programa de melhoramento.

A identificação de genótipos superiores é uma das principais atividades em um programa de melhoramento, que abrange tanto a identificação dos melhores genitores para inclusão em cruzamentos, como a seleção em populações segregantes e a utilização dos indivíduos selecionados no programa. Por isso, é importante o uso de metodologias que avaliem direta e indiretamente a tolerância ao frio para o estágio que se busca a tolerância.

De acordo com os resultados encontrados, o índice de velocidade de germinação obtido em laboratório, apresenta maior eficiência em identificar genótipos e populações com melhor desempenho no período germinativo, comparado com a avaliação em campo. O comprimento do coleóptilo e o índice de velocidade de germinação são as metodologias mais adequadas pela elevada associação com a germinação em baixas temperaturas.

A população obtida a partir do cruzamento realizado entre os genitores BRS SCS Tio Taka/Oro apresenta maior tolerância na germinação em baixas temperaturas.

A correlação de caracteres de germinação entre as gerações F3 e F4, indica que uma população considerada tolerante em F3 pode não manter o mesmo comportamento em F4.

Os resultados indicam que existe uma grande complexidade nas mudanças dos padrões de expressão gênica no genótipo sensível ao frio, pois, no transcriptoma desta cultivar ocorreu mudança na expressão de genes em várias fases do metabolismo.

Diferentemente do que aconteceu na cultivar sensível ao frio, na cultivar tolerante (Oro) poucos genes tiveram expressão gênica aumentada significativamente.

Uma lista de 55 genes com diferença na expressão comuns as duas cultivares e uma lista com 17 genes com diferença na expressão únicos para a cultivar tolerante Oro, foram selecionados para futuros trabalhos de validação da associação das diferentes respostas desses genes à tolerância ao frio na germinação de arroz.