

INTROGRESSÃO DE FRAGMENTOS DA ESPÉCIE SILVESTRE (*Oryza glumaepatula*) NO BACKGROUND GENÉTICO DO ARROZ CULTIVADO (*Oryza sativa*).

RANGEL, Priscila Nascimento¹; BRONDANI, Claudio²; RANGEL, Paulo Hideo Nakano³; BRONDANI, Rosana Pereira Vianelo⁴.

Palavras-chave: arroz, AB-QTL, *Oryza glumaepatula*

INTRODUÇÃO: A redução da variabilidade genética das variedades de arroz tem como principal consequência a redução dos ganhos genéticos. Por isso, um dos objetivos dos programas de melhoramento modernos de arroz tem sido a recuperação da diversidade perdida através da busca por alelos favoráveis em parentes silvestres (Gur e Zamir, 2004). As espécies silvestres de arroz constituem um reservatório gênico que pode ser explorado para o aumento da variabilidade genética e, conseqüentemente, dos ganhos de produção das variedades cultivadas. Além disso, estas espécies apresentam grande potencial como doadoras de genes de tolerância a estresses bióticos e abióticos, como tolerância à seca e à presença de minerais tóxicos no solo. O método de retrocruzamento avançado associado à análise de QTL (AB-QTL – Advanced Backcross QTL analysis) (Tanksley e Nelson, 1996) é uma ferramenta poderosa para a exploração e uso de espécies silvestres em programas de melhoramento e tem sido extensivamente utilizada nas últimas décadas com este fim (Brondani et al., 2002; Septiningsih et al., 2003; Aluko et al., 2004). Este método integra a análise de QTL à introgressão de alelos do germoplasma silvestre para o cultivado, assumindo que regiões do genoma ligadas a marcadores moleculares e associadas a características de interesse agrônomico podem ser transferidas para cultivares elite (Frary et al., 2004). Dessa forma, é possível monitorar a introgressão destes alelos e selecionar, utilizando marcadores moleculares, aqueles genótipos que possuem as regiões de interesse. Ao final, após algumas gerações de autofecundação, as linhagens de introgressão são obtidas e podem ser testadas no campo (Frary et al., 2004).

Método semelhante para a obtenção de linhagens de introgressão, também chamadas de linhagens de substituição (CSSL – Chromosome Segment Substitution Lines), tem sido utilizada recentemente com o objetivo de obter linhagens com fragmentos introgridos em regiões específicas do genoma (Silkova et al., 2006; Tian et al., 2006). Estas linhagens são resultado da utilização de seleção assistida por marcadores para introgridir pequenos segmentos cromossômicos do parental doador no background genético do parental cultivado por consecutivos retrocruzamentos e autofecundações (Tian et al., 2006).

Os objetivos deste trabalho foram: **1.** Caracterizar 35 linhagens do programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão que foram desenvolvidas através da metodologia de AB-QTL a partir de um cruzamento interespecífico utilizando a espécie silvestre *Oryza glumaepatula*. **2.** Construir um mapa genético para uma população segregante proveniente de cruzamento interespecífico entre um acesso da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* e uma variedade de arroz de terras altas (*Oryza sativa*) utilizando marcadores moleculares microssatélites (SSR – Simple

¹ UFG/ ICB IV/ Embrapa Arroz e Feijão. rangelpriscila@yahoo.com.br

² Embrapa Arroz e Feijão. brondani@cnpaf.embrapa.br

³ Embrapa Arroz e Feijão. phrangel@cnpaf.embrapa.br

⁴ Embrapa Arroz e Feijão. rosanavb@cnpaf.embrapa.br

Sequence Repeats) com a finalidade de selecionar marcadores flanqueando segmentos introgridos específicos.

MATERIAIS E MÉTODOS: O desenvolvimento das linhagens seguiu o método de AB-QTL utilizando como parental recorrente a linhagem BG90-2 (*O. sativa*) e como parental doador o acesso RS-16 (*O. glumaepatula*). Foram realizados dois retrocruzamentos seguidos por oito gerações de autofecundação (Rangel et al., 2005). Os marcadores moleculares associados às características: peso de 1000 grãos, número de perfilhos e número de panículas (Brondani et al., 2002) foram utilizados para a seleção assistida de 272 famílias RC₂F₆, das quais 27 foram selecionadas por conterem alelos favoráveis na região dos locos marcadores. Além disso, 8 famílias que apresentaram segregação transgressiva também foram selecionadas. As 35 linhagens RC₂F₈ obtidas foram avaliadas no campo, juntamente com três testemunhas (BG90-2, Metica 1, CNA8502), em ensaio conduzido no ano agrícola 2002/03 em três locais: Goianira - Goiás, Formoso do Araguaia - Tocantins e Boa Vista - Roraima. Foram coletados dados no cultivo principal (floração média, altura de planta, número de perfilhos e panículas por m² e produtividade de grãos em kg ha⁻¹) e na rebrota (número de perfilhos/panículas na mesma área de amostragem do cultivo principal e produtividade de grãos em kg/ha, obtidos apenas em Goiás e Roraima). Em 2003/04 as quinze linhagens que mais se destacaram no ensaio de 2002/03 foram avaliadas em cinco locais (Goianira - Goiás, Formoso do Araguaia - Tocantins, Boa Vista - Roraima, Itajaí - Santa Catarina e Alegrete - Rio Grande do Sul) com quatro testemunhas (BG90-2, BRS Formoso, Metica e IRGA 417). Foram coletados dados de produtividade de grãos em kg ha⁻¹, floração média e altura de planta. Folhas frescas de 10 plantas de cada uma das 35 linhagens foram coletadas, sendo o DNA extraído em bulk. Para a caracterização molecular foram utilizados 80 marcadores microssatélites. Destes, 67 foram marcados com fluorescência e analisados em seqüenciador automático de DNA ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Os marcadores fluorescentes foram reunidos em painéis contendo de 2 a 7 marcadores de acordo com a sua cor (azul ou verde) e amplitude alélica. A genotipagem foi realizada utilizando o software GeneMapper 2.5 (*Applied Biosystems*). Os produtos de PCR derivados dos marcadores não fluorescentes foram visualizados em géis desnaturantes de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata. O software CSSL Finder foi utilizado para estimar a proporção do genoma parental em cada linhagem e para a construção dos genótipos gráficos.

Para a obtenção da população de mapeamento o acesso GEN1233 (*O. glumaepatula*) foi cruzado com a variedade de arroz de terras altas Curinga (*O. sativa*). As plantas F₁ obtidas deste cruzamento foram avaliadas com 5 marcadores SSR para confirmação da sua heterozigosidade. As plantas F₁ heterozigotas para todos os locos testados foram retrocruzadas com a variedade Curinga para a obtenção de 59 plantas RC₁F₁. Estas plantas foram mapeadas com 97 locos SSR marcados com fluorescência e analisados em sequenciador automático de DNA ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Estes marcadores foram selecionados a partir do mapa referência do arroz (Ciat SSR 2006, disponível em www.gramene.org) com base na sua distribuição nos 12 cromossomos do arroz. O mapa genético foi construído utilizando o software Mapdisto versão 1.6 e os genótipos gráficos foram construídos utilizando o software CSSL Finder.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: A produtividade média dos três ensaios conduzidos em 2002/03 foi de 5885 kg/ha, sendo que a maior foi obtida no ensaio de Goiás (8010

kg/ha) e a menor no ensaio de Tocantins (4122 kg/ha). As linhagens CNAi 9937, CNAi 9931, CNAi 9934, CNAi 9930 e CNAi 9936 foram as mais produtivas no cultivo principal com 7398 kg ha⁻¹, 7338 kg ha⁻¹, 7135 kg ha⁻¹, 6998 kg ha⁻¹ e 6836 kg ha⁻¹, respectivamente, porém não diferiram significativamente das testemunhas BG90-2 e Metica 1. Considerando apenas os ensaios de Goiás e Roraima, a produtividade média dos dois locais no cultivo principal foi de 6767 kg/ha, sendo que as linhagens citadas acima mais a CNAi 9935 apresentaram produtividade média superior a 7500 kg ha⁻¹ e foram diferentes significativamente da Metica 1. Todas as linhagens apresentaram arquitetura de planta moderna com altura em torno de 100 cm, alta resistência ao acamamento e folhas eretas que se mantiveram verdes até a maturação dos grãos, característica esta de grande importância por estar relacionada com alta produtividade em arroz irrigado. A utilização da soca pode ser uma alternativa para aumentar a rentabilidade das lavouras de arroz irrigado do Brasil a um baixo custo. As linhagens de introgressão, além do elevado vigor de plântula, apresentaram alta capacidade de rebrota viabilizando o aproveitamento da soca. As linhagens CNAi 9935 e CNAi 9936 apresentaram produtividade média de grãos na rebrota de 2627 kg/ha e 2688 kg/ha, respectivamente, o que correspondeu a 34% e 35% da produtividade obtida no cultivo principal. No ensaio realizado em 2003/04 verificou-se que as quinze linhagens que se destacaram em 2002/03 mantiveram o seu desempenho, apresentaram elevada produtividade nos locais de avaliação e foram diferentes significativamente das testemunhas. Nos ensaios de Santa Catarina e Rio Grande do Sul as linhagens CNAi 9931, CNAi 9934, CNAi 9937 e CNAi 9930 foram significativamente superiores à testemunha Metica 1. Na média dos oito ambientes de avaliação, seis linhagens, CNAi 9931, CNAi 9934, CNAi 9937, CNAi 9930, CNAi 9936 e a CNAi 9935, mantiveram-se como as mais produtivas e superaram significativamente a testemunha Metica 1. A caracterização molecular detectou fragmentos de *O. glumaepatula* introgridos em todas as 35 linhagens. O número médio de fragmentos introgridos em cada linhagem variou de 2 a 17 com uma média de 7,2 e a proporção de introgressão média foi de 7,94%, variando de 1,92% (CNAi 9932) a 21,15% (CNAi 9920-78). As linhagens que mais se destacaram nas avaliações fenotípicas (CNAi 9930, CNAi 9931, CNAi 9934, CNAi 9935, CNAi 9936 e CNAi 9937) apresentaram proporções de introgressão de 3,85%, 2,88%, 2,88%, 4,81%, 5,77% e 6,73%, respectivamente, indicando que fragmentos menores produzem melhores efeitos no background genético do arroz cultivado, provavelmente pela diminuição da *linkage drag*. As linhagens de introgressão provavelmente são importante reservatório de alelos que não existem no "pool" gênico do arroz cultivado e as informações obtidas neste trabalho serão úteis para seu uso pelos melhoristas do programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão. A linhagem CNAi 9930, por ter apresentado alta produtividade e grãos com qualidade comercial, está sendo avaliada e o seu uso para cultivo, especialmente por pequenos agricultores, deverá ser recomendado. Estes agricultores terão nela a possibilidade de potencializar a sua produção através do cultivo da rebrota.

O mapa genético para a população do cruzamento interespecífico GEN1233 (*O. glumaepatula*) x Curinga (*O. sativa*) foi construído com 97 marcadores SSR. Os genótipos gráficos revelaram que a constituição genotípica das plantas RC₁F₁ foi, em média, 52,54% de homozigotos para o alelo do parental recorrente (Curinga) e 45,11% de heterozigotos (Curinga/GEN1233), mantendo-se dentro da proporção Mendeliana esperada para este tipo de população (1:1). Com base nas informações obtidas através dos genótipos gráficos, 3 marcadores que flanqueiam cada fragmento introgridido selecionado serão escolhidos a partir do mapa genético para monitorar a presença destes fragmentos em 500 plantas RC₂F₁ que estão sendo obtidas através

do segundo retrocruzamento das plantas RC₁F₁ com a variedade Curinga. A partir de então, somente as plantas que contiverem os fragmentos introgrididos nas regiões desejadas serão novamente retrocruzadas para originar aproximadamente 300 plantas RC₃F₁. Simultaneamente, famílias RC₂F₃ serão avaliadas em campo experimental para características relacionadas a produção, tais como número de panículas e peso de 1000 grãos, e para tolerância a seca, quando serão submetidas a estresse hídrico a partir da fase de floração. O objetivo final do trabalho será obter linhagens de incorporação que contenham fragmentos silvestres introgrididos em regiões específicas do genoma e que apresentem características favoráveis aos programas de melhoramento de arroz de terras altas.

CONCLUSÕES: A caracterização agrônômica e molecular das 35 linhagens de introgressão forneceu informações úteis para a sua utilização pelos programas de melhoramento de arroz irrigado.

O mapa genético da população segregante proveniente do cruzamento GEN1233 x Curinga servira de base para a seleção de locos a serem utilizados nas etapas posteriores de obtenção de linhagens de introgressão para os programas melhoramento de arroz de terras altas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALUKO, G.; MARTINEZ, C.; THOME, J.; CASTANO, C.; BERGMAN, C.; OARD, J. H. QTL mapping of grain quality traits from the interspecific cross *Oryza sativa* x *O. glaberrima*. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 109, p. 630-639, 2004.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 104, p. 1192-1203, 2002.
- FRARY, A.; FULTON, T. M.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S. D. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae. **Theoretical and Applied Genetics** . v. 108, p. 485-496, 2004.
- GUR, A.; ZAMIR, D.; Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. **PLOS Biology**. v. 2, p. 1610-1615, 2004.
- RANGEL, P. H.; BRONDANI, C.; RANGEL, P. N.; BRONDANI, R. P. V.; ZIMMERMANN, F. J. P. Development of rice lines with gene introgression from the wild *Oryza glumaepatula* by the AB-QTL methodology. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 5, p. 10-21, 2005.
- SILKOVA, O. G.; DOBROVOLSKAYA, O. B.; DUBOVETS, N. I.; ADONINA, I. G.; KRAVTSOVA, L. A.; ROEDER, M. S.; SALINA, E. A.; SHCHAPOVA, A. I.; SHUMNY, V. K. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR markers. **Russian Journal of Genetics**. v. 42, p. 645-653, 2006.
- TIAN, F.; LI, J.; FU, Q.; ZHU, Z. F.; FU, Y. C.; WHANG, X. K.; SUN, C. Q. Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 112, p. 570-580, 2006.
- TANKSLEY, S. D.; NELSON, J. C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted

germplasm into elite breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 92, p. 191-203, 1996.

AGRADECIMENTOS: A UFG pela bolsa de doutorado concedida a Priscila Nascimento Rangel, ao CNPq e Generation Challenge Program pelo financiamento das pesquisas.