

# **CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE ALTO RENDIMENTO EM LINHAGENS DE ARROZ DERIVADAS DO CRUZAMENTO DE *ORYZA SATIVA* (CICA-8) X *ORYZA GLUMAEPATULA* (RS-16).**

**MELO, Arthur Tavares de Oliveira**<sup>1</sup>; **BRONDANI, Rosana Pereira Vianello**<sup>2</sup>; **RANGEL, Priscila Nascimento**<sup>2</sup>; **RANGEL, Paulo Hideo Nakano**<sup>2</sup>; **MENDONÇA, João Antônio**<sup>2</sup>; **BRONDANI, Claudio**<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia; <sup>2</sup>Universidade Federal de Goiás, Goiânia.  
**arthurmelobio@gmail.com**

Palavras chave: Cruzamento Interespecífico; Introgressão Gênica; Análise de QTL

## **INTRODUÇÃO**

O uso de genitores muito aparentados nos programas de melhoramento, além das conseqüências do processo de domesticação e severos efeitos “bottleneck” sofrido por populações de arroz resultaram no estreitamento da base genética dessas populações para obtenção de novas cultivares e conseqüente diminuição dos ganhos genéticos com a seleção ( Tanksley and McCouch, 1997). A limitada variabilidade genética de cultivares de arroz resulta em maior vulnerabilidade á pragas e doenças bem como a diminuição da sua capacidade adaptativa a condições ambientais adversas. 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, uma vez que estes parentes silvestres apresentam um pool gênico importante que pode ser usado como fonte de alelos de características simples como resistência a doenças e outras tensões ambientais e características complexas como o rendimento (Swamy e Sarla, 2008), mostrando que este germoplasma silvestre não só pode ser usados como uma fonte de variabilidade, mas também contribuindo com rendimento de alelos crescente na população (Brondani et al., 2002; Swamy e Sarla, 2008). Neste contexto, que se utilizam as estratégias das análises de AB-QTL combinadas com marcadores genéticos em desequilíbrio de ligação com estes QTLs para identificação de regiões cromossômicas com alelos favoráveis do doador selvagem. Portanto, este trabalho tem como objetivo, executar a caracterização molecular e agrônômica de 114 linhagens de introgressão derivadas do cruzamento interespecífico entre a cultivar elite Cica-8 (*Oryza sativa*) e o acesso silvestre RS-16 (*Oryza glumaepatula*). As caracterizações foram realizadas em gerações BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> e BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub>, observando o comportamento dos segmentos selvagens introgredidos, permitindo fazer uma análise comparativa entre os QTLs detectados para produtividade em ambas às gerações e selecionar as linhagens de introgressão mais produtivas para uso nos programas de melhoramento.

## MATERIAL E MÉTODOS

A população experimental foi composta por uma cultivar elite usada como parental recorrente nos dois retrocruzamentos - o Cica-8 (*Oryza sativa*) e por uma espécie diploide, autógena encontrada na América do Sul e Central, coletada na região do rio Negro na bacia amazônica, usada como parental doador – RS-16 (*Oryza glumaepatula*). Um total de 186 plantas de  $BC_2F_2$  foram obtidas do primeiro retrocruzamento e genotipada usando 149 marcadores moleculares para a construção de um mapa de ligação (Rangel et al., 2007). Posteriormente num segundo retrocruzamento, um total de 114 plantas  $RC_2F_2$  foram avançadas até a geração  $RC_2F_9$  pelo método de *single seed descent* (SSD), onde apenas uma semente de cada planta é semeada após cada geração de autofecundação. Para análise fenotípica, 114 plantas da geração  $RC_2F_2$  foram avaliadas em um campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão em Goiânia, Estado de Goiás. Dez plantas de cada parcela foram retiradas aleatoriamente para medição de dias para o florescimento, altura da planta, número de perfilhos por planta, número panícula e rendimento de cada planta.

No segundo julgamento fenotípico, 114 linhagens de introgressão  $RC_2F_9$  foram avaliadas para rendimento de grãos em três localidades no Brasil: Alegrete, Estado do Rio Grande do Sul, Goianira, Estado de Goiás e Boa Vista, Estado de Roraima. A produção de grãos foi medida como o peso de matéria seca total de grãos (em gramas) de dez plantas tomadas ao acaso em cada parcela. Na análise molecular as plantas da geração  $BC_2F_2$  foram genotipadas por 121 marcadores microssatélites e 10 ESTs (sequências expressas) distribuídos ao longo dos 12 cromossomos do arroz (Rangel et al., 2007). Foram feitas Reações da Polimerase em Cadeia (PCR) para amplificação dos marcadores moleculares em ambas as gerações. Produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 5% corado com brometo de etídio ( $0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e quando necessária a visualização de polimorfismo, na geração  $BC_2F_2$ , entre os alelos, usado gel de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata. Já as linhagens de introgressão  $BC_2F_9$  foram genotipadas usando marcadores microssatélites fluorescentes. A eletroforese foi realizada em um analisador de DNA ABI 3100 automatizados (Applied Biosystems) e genotipagem do polimorfismo entre os alelo foi realizada utilizando o software GeneMapper 2.5 (Applied Biosystems). As proporções introgridas no genoma recorrente da espécie, tanto em famílias  $BC_2F_2$  como em  $BC_2F_9$  foram estimados e gráficos genótipos foram construídos utilizando o software GGT 2,0 (Van Berloo, 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação fenotípica das 114 famílias BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> revelou que o número médio de dias até o florescimento foi de 116, variando de 79 a 124, e que a maioria das famílias floresceram no mesmo intervalo de tempo que o parental recorrente Cica-8 (122 dias; Scott e Knott p <0,05). Dentre a família BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> foram identificadas cinco linhagens de introgressão (5, 60, 62, 86 e 106) como as mais produtivas em pelo menos dois dos três locais de avaliação e a linhagem 62 foi um dos genótipos mais produtivos também no experimento realizado para famílias BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>. Na comparação de produtividade entre as famílias BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> e BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> cinco linhagens (27, 46, 62, 88 e 110) com alta proporção de introgressão apresentaram-se altamente produtivas em pelo menos um, dos três, lugares de avaliação fenotípica (Tabela 1).

Linhagens de Introgressão	BC <sub>2</sub> F <sub>2</sub>		BC <sub>2</sub> F <sub>9</sub>			
	Produtividade (kg ha-1)	Proporção de Introgressão (%)	Produtividade (kg ha-1)			Proporção de Introgressão (%)
			Goiania	Alegrete	Goianira	
5	4.052	18	<b>7.645</b>	<b>7.869</b>	8.439	30,2
27	5.916	14,6	<b>8.133</b>	6.249	8.132	13,1
46	6.402	5,6	<b>7.728</b>	6.211	8.444	9,3
60	4.044	28	<b>9.427</b>	<b>8.105</b>	8.622	34,3
62	6.330	13	<b>7.391</b>	6.161	<b>9.883</b>	8,5
86	4.036	14,8	5.645	<b>7.728</b>	<b>9.311</b>	4
88	6.352	26,5	<b>8.635</b>	6.211	7.745	0,8
106	3.614	21,4	<b>9.621</b>	6.088	<b>9.749</b>	3,5
110	6.340	29,7	5.050	6.458	<b>10.541</b>	3,1
Cica-8	6.596	-	6.858	7.124	8.704	-

Tabela 1: Produtividade média e proporção de introgressão de nove linhas altamente produtivas nas gerações BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> e BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> nos respectivos locais de avaliação. Os números em negrito representam à produtividade média superior em relação a cultivar Cica-8 em cada local.

A caracterização molecular da geração BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> foi realizada através de 131 marcadores moleculares microssatélites distribuídos ao longo dos 12 cromossomos do arroz cobrindo 1.636,7 cM do genoma e com uma distância de 12,5 cM entre os locos analisados. O número de segmentos introgrididos em heterozigose contendo alelos selvagens variou de três (planta 112) a 23 (planta 68), com uma média de 10 segmentos introgrididos por planta. Já a geração BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> foi genotipada usando 60 marcadores microssatélite também distribuídos uniformemente ao longo dos 12 cromossomos do arroz, abrangendo 1.594,6 cM do genoma total e com uma distância de 26,6 cM entre os marcadores. O número médio de fragmentos selvagens introgrididos foi de 11,5 variando de 6 (planta 47) a 19 (plantas 60 e 114). A média de fragmentos em homozigose introgrididos foi de 9,1% variando de zero a 34,3% (planta

60), bem como a porcentagem de segmentos em heterozigose contendo alelos silvestres foi de 3,2% variando de zero a 24,4% (planta 77).

As análises de QTL foram feitas usando os métodos baseados no mapeamento de um único marcador (*single marker analysis* – SMA) e no mapeamento de intervalo composto (*composite interval mapping* – CIM). Na geração BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> foram detectados 18 QTLs no mapeamento de um único marcador (SMA) e nove no mapeamento de intervalo composto (CIM), sendo que destes nove, pelo menos um foi detectado também em SMA. Características altamente relacionadas como número de perfilho e panícula foram mapeadas no mesmo intervalo genômico nos cromossomos 7 (4752 – RM82) e 11 (5335 – RM20). Dois QTLs foram detectados para produtividade, nos cromossomos 4 (4797 – EST20) e 11 (4599 – RM202), explicando 21,29% e 13,38% da variação fenotípica, uma vez que o EST20 foi desenvolvido de uma seqüência expressa da enzima xiloglucano endotransglicosilase (XET) que atua no crescimento de parede celular (Rangel, et al., 2007). A análise baseada no método SMA detectou sete marcadores associados à produtividade nos três locais de avaliação da família BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub>. O loco 4879 no cromossomo 4, que foi associado com a produção em Alegrete, Rio Grande do Sul. O marcador RM01, no cromossomo 1, detectado pela análise SMA em Alegrete, apresentou um QTL associativo, também para produtividade, em linhagens de introgressão provenientes do cruzamento interespecífico entre BG90-2 (*O. sativa*) e RS-16 (*O. glumaepatula*) (Rangel, et al., 2008). Dois outros QTLs foram detectados pela análise CIM para produtividade em Boa Vista, Roraima no cromossomo 2 (OG17 – RM263) e 4 (4879 – EST20) explicando assim proporções elevadas da variação fenotípica observada (53,72% e 44,47% respectivamente). Entretanto, o QTL associativo encontrado no cromossomo 4 foi também detectado nas famílias BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> na análise CIM.

Pode-se inferir que a observação de segregação transgressiva para rendimento em uma geração, como em BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> pode não ser resultado da heterose, mas sim de alelos selvagens complementares a alelos de vários locos do parental recorrente, o que pode explicar o aumento do número de perfilho, panícula e produtividade nessa geração, uma vez que essa segregação transgressiva é observada comumente em populações interespecíficas (Brondani et al., 2002; Rangel et al., 2008). Sete linhagens de introgressão BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> (27, 46, 62, 86, 88, 106 e 110) mostraram estabilidade de rendimento entre os locais avaliados, além de apresentar proporções de introgressão baixa, variando de 3,1% a 13,1%,. Rangel et al. (2008) avaliou um grupo de 35 linhagens de introgressão a partir do cruzamento interespecífico *O. sativa* x *O. glumaepatula* e descobriram que as linhagens mais produtivas apresentaram as menores proporções de introgressão, sugerindo que o aumento do rendimento foi resultado da falta de alelos selvagens com efeito deletério relacionados à produção. Essa estabilidade de rendimento observada para as linhagens de introgressão

tanto em BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> quanto em BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub>, através da ação complementar de alelos silvestres, é de grande interesse porque estas duas gerações foram avaliadas em quatro locais diferentes em dois anos, indicando que estas linhagens poderiam ser selecionadas para utilização em programas de melhoramento. Portanto, como as linhagens foram avançadas de BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> para BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> sem seleção, os efeitos positivos sobre a produtividade dos fragmentos silvestres introgridos foram mantidos com sucesso através das gerações. Nas plantas BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> houve uma média de introgressão em heterozigose de 3,2%. Um nível baixo se comparado com Tian et al. (2006) que caracterizou a introgressão de segmentos de 214 BC<sub>4</sub>F<sub>4</sub> de linhagens do cruzamento de *O. sativa* e *O. rufipogon* e observou uma média de 38,4% de segmentos heterozigóticos, sugerindo que o baixo nível de polinização cruzada esperada em arroz e conseqüentemente um baixo nível de segmentos em heterozigose introgridos foram bem controlados pelo método *single seed descent* (SSD).

As regiões amplificadas pelos marcadores 4879 e EST20, associadas a um QTL para produção de grãos na geração BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> que explicou a alta proporção da variação fenotípica (44,47%), indica que esta região tem um grande impacto sobre a produtividade em populações interespecíficas, determinando que o EST-20 se comporta como um forte candidato para mapeamento associativo de diversas linhagens de arroz, a fim de confirmar a associação deste marcador com o rendimento. Outro marcador candidato a sofrer análises de seleção assistida e mapeamento associativo é o RM 01 (cromossomo 1), por apresentar associação a um QTL para produtividade nas linhagens de introgressão BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub>, nas linhagens interespecíficas derivadas do cruzamento de BG90-2 x RS-16 (Rangel et al., 2008), além da geração BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (Brondani et al., 2002).

## CONCLUSÃO

Nove linhagens de introgressão com altas produtividades em diferentes anos, diferentes locais e diferentes gerações (BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> e BC<sub>2</sub>F<sub>9</sub>) foram identificadas. Portanto, tornando-se disponíveis aos programas de melhoramento de arroz para desenvolvimento de novas cultivares ou teste de outras características economicamente importantes, tais como doenças. As análises de QTL revelaram que dois marcadores (EST20 – cromossomo 4 e RM01 – cromossomo 1) tiveram associação positiva com produtividade. A identificação destes QTLs indica a necessidade de se fazer uma seleção assistida através de marcadores moleculares e uma análise mais refinada para testar o efeito destes QTLs em diferentes origens genéticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brondani C, Brondani RPV, Rangel PHN, Ferreira ME. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**. 104:1192-1203. 2002.

Rangel PN, Brondani RPV, Coelho ASG, Rangel PHN, Brondani C. Comparative linkage mapping of *Oryza glumaepatula* and *Oryza sativa* interspecific crosses based on microsatellite and expressed sequence tag markers. 30:614-622. 2007.

Rangel PN, Brondani RPV, Rangel PHN, Brondani C. Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the interspecific cross *Oryza sativa* (BG90-2) X *Oryza glumaepatula* (RS-16). **Genetics and Molecular Research**. 7:184-195. 2008.

Swamy BPM, Sarla N. Yield-enhancing quantitative trait loci (QTLs) from wild species. **Biotechnology Advances**. 26:106-120. 2008.

Tanksley SD, McCouch SR. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**. 277:1063-1066. 1997.

Tian F, Li DJ, Fu Q, Zhu ZF, Fu YC, Wang XK, Sun CQ. 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**. 112:570-580. 2006.

Van Berloo R. GGT: Software for the display of graphical genotypes. **Journal of Heredity**. 90:328-329. 1999.