

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS LINHAGENS DE ARROZ IRRIGADO RESISTENTES A HERBICIDA

Paulo Hideo Nakano Rangel¹; Márcio Elias Ferreira²; Francisco Pereira Moura Neto³; Ariano Martins Magalhães Junior⁴; Aluana Gonçalves de Abreu⁵

Palavras-chave: *Oryza sativa*, resistência à imidazolinona, retrocruzamento, marcadores moleculares, chip de DNA.

INTRODUÇÃO

Apesar da produção nacional de arroz estar dispersa em todo o país, os principais Estados produtores em 2011 foram o Rio Grande do Sul com 64,3%, Santa Catarina com 9,2%, Mato Grosso com 5,6%, Maranhão com 5,6% e Tocantins com 3,8%. (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012). Portanto, o arroz irrigado foi, em 2011, responsável por aproximadamente 77% da produção brasileira de arroz. O desenvolvimento de cultivares de arroz com resistência genética a herbicida que apresente um amplo espectro de controle de ervas daninhas é reconhecido com uma das principais estratégias que contribuem para aumento da produtividade de arroz. As imidazolinonas são herbicidas que têm efeito tóxico em espécies dicotiledôneas, gramíneas e ciperáceas, mas mostram baixa toxicidade em mamíferos, além de baixo impacto ambiental. Elas controlam as ervas daninhas pela desativação da enzima ALS ou sintase de acetolactato (*acetolactate synthase* – EC 4.1.3.18), também conhecida como AHAS (*acetohydroxiácido sintase*), que age na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada em plantas. Entretanto, algumas mutações naturais ou induzidas no gene ALS podem causar tolerância ao herbicida do grupo químico das imidazolinonas. Linhagens mutantes têm sido utilizadas como doadoras do gene de resistência para cultivares superiores em programas de retrocruzamento. A transferência do gene de resistência pode ser feita mais rapidamente e de maneira mais precisa utilizando marcadores moleculares em programas de retrocruzamento assistido. Na Embrapa, um chip de DNA composto de 4300 marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) vem sendo utilizado na introgressão de genes de interesse econômico em linhagens elite, em apoio ao programa de melhoramento genético. O alinhamento dos genomas possibilitou a seleção de milhares de marcadores SNPs distribuídos nos 12 cromossomos da espécie. Filtros de seleção com diferentes níveis de estringência foram aplicados para seleção dos SNPs, com o objetivo de aumentar a acurácia e a eficiência da genotipagem e diminuir o custo da análise de DNA.

O objetivo deste estudo foi: a) desenvolver um conjunto de linhagens quase-isogênicas de arroz irrigado tolerantes a herbicidas da classe imidazolinona; b) estimar o nível de recuperação do genoma do genitor recorrente nas linhagens desenvolvidas utilizando marcadores SNP; e c) verificar se as novas linhagens resistentes a herbicida comportam-se como linhagens quase-isogênicas.

MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento das novas linhagens de arroz irrigado resistentes ao herbicida do grupo das imidazolinonas foi realizado na Embrapa Arroz e Feijão em Santo Antônio de

¹ Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO 462, km 12, Zona Rural, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO, paulo.hideo@embrapa.br

² Ph.D. Genética Molecular, Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.

³ Ms.C. Fitotecnia, Embrapa Arroz e Feijão

⁴ Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Clima Temperado

⁵ Doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Arroz e Feijão.

Goiás, GO, utilizando o método do retrocruzamento. Os genitores recorrentes foram as cultivares comerciais de arroz irrigado BRS 7 Taim e BRS Pelota. O doador do gene de resistência ao herbicida foi a cultivar Cypress CL. Foram realizados três retrocruzamentos (RC₁ a RC₃) para BRS 7 Taim e BRS Pelota, seguidos por três gerações de autofecundação (RC₃F₁ a RC₃F₃). As sementes das gerações segregantes foram plantadas em bandejas de plástico em casa de telada. Vinte dias após a emergência das plantas foi feita a aplicação do herbicida do grupo químico das imidazolinonas, produto comercial Kifix na dosagem de 180 gramas ha⁻¹, mais o adesivo Dash 0,5% v/v. Dez dias após a aplicação do herbicida, as plantas tolerantes foram identificadas e transplantadas para vasos e, no florescimento, realizado o retrocruzamento individualizado com os respectivos genitores recorrentes. Os testes de progênies foram realizados na geração RC₃F₃, quando foram selecionadas as linhagens homozigotas para o alelo de resistência.

Após avaliações preliminares, realizadas no Rio Grande do Sul, foram selecionadas oito linhagens oriundas da BRS 7 Taim e uma da BRS Pelota que, juntamente com os respectivos genitores recorrentes, foram avaliadas para características agrônomicas em oito ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) conduzidos no Rio Grande do Sul, sendo quatro em 2010/11 e quatro em 2011/12. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. A parcela foi formada por oito linhas de 5,0 m de comprimento. As características avaliadas no campo foram: floração média, altura de planta (cm), resistência ao acamamento (escala de notas de 1 – sem acamamento - a 9 – plantas totalmente acamadas), e incidência de doenças: escaldadura da folha (*Monographella albescens*), mancha parda (*Drechslera oryzae*) e mancha dos grãos (causada por um complexo de fungos). Em ensaio conduzido no Campo Experimental da Fazenda Palmital em Goianira, GO, avaliou-se as injúrias causadas pelo herbicida Kifix aplicado vinte dias após a emergência das plantas na dosagem de 100 gramas ha⁻¹, mais o adesivo Dash 0,5% v/v. Trinta dias após foram dadas as notas de injúria utilizando uma escala de notas de 1 – sem injúria - a 9 – plantas mortas na parcela. As linhagens foram também avaliadas para rendimento de grãos inteiros e total em moinho de prova de grãos. Utilizando o Analisador Estatístico de Grãos Mod. S21 foram obtidos a percentagem de grãos gessados na amostra, comprimento, largura e relação comprimento/largura dos grãos.

Os dados de produtividade de grãos foram submetidos à análise de variância individual e conjunta considerando anos e locais com fatores aleatórios e os efeitos de tratamentos como fator fixo. A hipótese de nulidade do efeito de tratamentos foi analisada pelo teste de F e as médias de tratamentos foram comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Folhas de cem plantas RC₃F₃ de cada uma das três linhagens mais promissoras (AB10120, AB10124 e AB10125), selecionadas nos ensaios de campo, foram usadas para extração de DNA. A genotipagem foi realizada com o chip de DNA OSBR (Embrapa), baseado em tecnologia Illumina Infinium®, contendo 4300 marcadores SNPs, distribuídos nos 12 cromossomos de arroz. Os marcadores SNP foram selecionados com base no sequenciamento e alinhamento dos genomas de oito variedades de arroz de sequeiro (*japonica*), tendo como referência a sequência da cultivar Nipponbare. Filtros de seleção com diferentes níveis de stringência foram aplicados para a seleção dos SNPs, com o objetivo de aumentar a acurácia e a eficiência da genotipagem, e diminuir o custo da análise de DNA. A análise também incluiu 22 acessos do Banco de Germoplasma de Arroz, mantido pela Embrapa Arroz e Feijão, incluindo variedades *indica* e *japonica*: Chorinho, Puteca, IAC 165, Primavera, Azucena, Moroberekan, Catetão, Ligeiro, F1 IAC 165 x Primavera, BRS 7 Taim, BRS Sinuelo CL, BRS Formoso, BRS Alvorada, Inta Puitá CL, BRS Pampa, Cypress Cl, IRGA 417, BRS Esmeralda, IRBB1, IRBB3, IRBB5, Nipponbare. Os dados genotípicos foram usados para caracterizar o nível de variação genética residual dentro das linhagens quase-isogênicas em relação ao parental recorrente, a identidade genética de cada acesso, e as relações de vínculo genético entre os acessos incluídos na análise. Os valores de similaridade genética em comparações pareadas entre as progênies RC₃F₃ das três linhagens mais promissoras e os 22 acessos de arroz, incluindo os controles

parentais Cypress CL e BRS 7 Taim, foram estimados utilizando o coeficiente de “band” (Lynch, 1990). As estimativas de similaridade genética foram calculadas com o software NTSYS 2.02 (Rohlf, 2002). Uma análise de coordenadas principais foi empregada para evidenciar eventuais diferenças de agrupamento genético entre as progênes RC₃F₃, os controles parentais e os acessos do Banco de Germoplasma. Os dados fenotípicos e genotípicos foram usados para avaliar o comportamento das linhagens quase-isogênicas em relação ao parental recorrente, BRS 7 Taim. Os dados foram usados para estimar o grau de recuperação do genoma do parental recorrente (BRS 7 Taim) e a similaridade genética entre as novas linhagens, as linhagens parentais e os acessos das subespécies *indica* e *japonica* empregados na análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os dados de produtividade média de grãos, floração média, altura, acamamento e injúrias ocasionadas pela aplicação do herbicida. As linhagens apresentaram produtividades de grãos semelhantes aos seus respectivos genitores, o que foi evidenciado por diferenças não significativas entre as médias das linhagens pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Da mesma forma, observou-se que as médias de floração e altura de planta das linhagens foram também semelhantes às dos seus respectivos parentais recorrentes (BRS 7 Taim e BRS Pelota). De maneira geral, as linhagens mostraram-se resistentes ao acamamento. As linhagens AB10123 e AB10119 apresentaram notas de injúria de 9 e 7, respectivamente. Isto pode ter ocorrido devido ao escape durante o processo de seleção, detectado no ensaio de VCU conduzido em Santo Antônio de Goiás, GO.

Tabela 1. Dados de média de produtividade de grãos (PROD), por ano agrícola (2010-11 e 2011-12) em kg ha⁻¹, floração média (FLO), altura de planta (ALT), acamamento (ACA) e injúria (INJ) das linhagens resistentes à herbicida.

Linhagem	Cruzamento	PROD	2010-11	2011-12	FLO	ALT	ACA	INJ
AB10125	BRS Taim///Cypress CL	8394 ab	8396 ab	8392 ab	89	86	3	1
AB10120	BRS Taim///Cypress CL	8265 ab	8111 ab	8420 ab	90	88	3	1
AB10124	BRS Taim///Cypress CL	8217 ab	7799 ab	8635 ab	89	86	2	1
AB10122	BRS Taim///Cypress CL	8144 ab	8081 ab	8206 ab	89	86	3	1
AB10126	BRS Taim///Cypress CL	8099 ab	7644 ab	8555 ab	89	85	3	1
AB10121	BRS Taim///Cypress CL	8090 ab	7984 ab	8195 ab	93	91	1	1
AB10123	BRS Taim///Cypress CL	7926 ab	7765 ab	8087 ab	89	97	2	9
AB10127	BRS Pelota///Cypress CL	7882 ab	7111 ab	8652 ab	90	87	1	1
AB10119	BRS Taim///Cypress CL	7518 ab	6730 ab	8305 ab	89	89	2	7
BRS Taim	Testemunha	8232 a	7951 a	8513 a	91	85	1	1
BRS Pelota	Testemunha	8108 b	8205 b	8010 b	88	91	2	1
	CV%	14,71	17,72	11,45				

Médias seguidas pela mesma letra não diferem das testemunhas pelo teste de Dunnett a 5%.

As linhagens CL, de maneira geral, apresentaram resistência à escaldadura da folha e a mancha dos grãos, elevados rendimentos de grãos inteiros (> 60%) e total (>70%), baixa incidência de grãos gessados e grãos do tipo agulhinha (Tabela 2). Quanto à mancha parda, algumas linhagens CL (AB10125, AB10122, AB10126 e AB10121) apresentaram suscetibilidade.

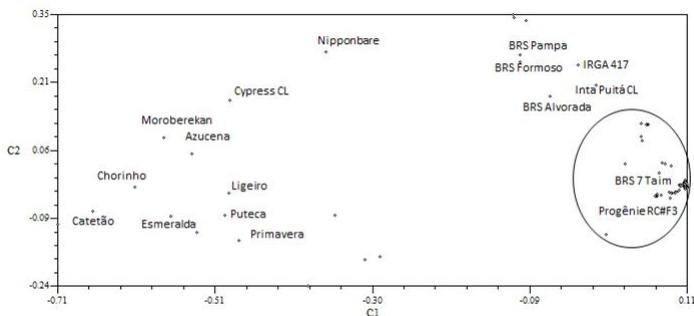
Os dados de análise de campo foram utilizados para selecionar as três linhagens mais promissoras, por reunirem um maior número de características agrônomicas favoráveis. Estas linhagens foram genotipadas com um chip de DNA, composto por 4300 marcadores SNPs. Os índices de recuperação do genoma das três linhagens mais promissoras foram: AB10120 (96,28%), AB10124 (95,82%) e AB10125 (94,64%). As amostras das progênes RC₃F₃ das novas linhagens com resistência a herbicida agruparam com o parental recorrente BRS 7 Taim, apresentando alto nível de similaridade genética. Outros acessos da subespécie *indica*, selecionados no Banco de Germoplasma, agruparam com a cultivar BRS 7 Taim e as novas linhagens. Diferenças genéticas foram corroboradas pela análise de

coordenadas principais (Figura 1). Os dados moleculares indicam, assim como os dados agronômicos e de qualidade de grãos, que as novas linhagens tolerantes a imidazolinona comportam-se como linhagens quase-isogênicas à cultivar BRS 7 Taim.

Tabela 2. Dados de incidência de escaldadura da folha (ESC), mancha parda (MP) e mancha dos grãos (MG), rendimento de grãos inteiros (INT) e total (TOT), grãos gessados, comprimento (C), largura (L) e relação C/L dos grãos das linhagens CL.

Linhagem	ESC	MP	MG	INT	TOT	Gessados %	C	L	C/L
AB10125	2	4	3	67,02	71,50	2,37	6,34	1,96	3,24
AB10120	2	3	3	62,27	71,49	2,93	6,40	2,02	3,17
AB10124	1	3	3	63,85	71,00	2,24	6,31	1,97	3,20
AB10122	3	4	3	64,00	71,54	3,34	6,37	1,99	3,20
AB10126	1	4	3	61,66	71,14	2,86	6,26	2,00	3,13
AB10121	1	4	2	62,88	70,92	1,24	6,28	1,98	3,17
AB10123	1	3	2	60,71	70,35	2,50	6,36	2,00	3,18
AB10127	1	3	2	62,24	71,22	3,66	6,33	1,94	3,27
AB10119	2	3	2	61,40	70,85	4,50	6,21	1,98	3,13
BRS Taim	3	3	3	65,65	71,99	2,92	6,40	2,00	3,20
BRS Pelota	3	2	2	63,38	70,65	2,65	6,19	1,89	3,28

Figura 1. Agrupamento de plantas e acessos de arroz através de análise de coordenadas principais (C1= 34,36%; C2=11,70%) baseada em polimorfismo de marcadores SNP distribuídos ao longo do cromossomo de arroz. Progenies RC₃F₃ (círculo) apresentam alta similaridade genética com o genitor recorrente BRS 7 Taim.



CONCLUSÃO

As linhagens CL AB10125, AB10120 e AB10124 apresentam um maior número de características agronômicas favoráveis.

A linhagem AB10125 possui uma taxa de conversão para a BRS 7 Taim de 95% e deverá ser lançada com nova cultivar de arroz irrigado para o Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LYNCH, M. 1990 The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, v7, p.478-484, 1990.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012. Projeções do Agronegócio – Brasil 2011/2012 a 2021/2022. Assessoria de Gestão Estratégica, Brasília, DF, 26p.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc: numeric taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter Software, 2002.