

PIRAMIDIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE MULTILINHAS DE ARROZ IRRIGADO COM RESISTÊNCIA ESTÁVEL À BRUSONE (*Pyricularia grisea*)

Paulo Hideo Nakano Rangel¹; Márcio Elias Ferreira²; Justino José Dias Neto³; Liamar Maria dos Anjos⁴

Palavras-chave: *Oryza sativa*, cultivares, diversidade de patótipos, produtividade de grãos

INTRODUÇÃO

Na região tropical do Brasil, a doença causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. (telomorfo *Magnaphorte grisea*) é o principal obstáculo à expansão da rizicultura e ao incremento de produtividade no campo. O fungo provoca na planta do arroz uma infecção sistêmica, conhecida como brusone, que afeta significativamente o desenvolvimento e a produtividade da planta de arroz, causando manchas e lesões nas folhas, panículas e grãos. A infecção, eventualmente, leva à morte da planta. O Vale do Rio Araguaia no Estado do Tocantins é considerado o terceiro maior produtor de arroz irrigado do Brasil. Dias Neto et al. (2010) utilizando dados de 479 isolados de *M. grisea*, coletados na região, identificaram 61 raças pertencentes a todos os grupos de raças fisiológicas, com exceção de uma (IH). Estas áreas de arroz irrigado nos Estados de Goiás e Tocantins tem a maior diversidade de patótipos de *M. grisea* detectada até agora no país e são centros de diversidade de patótipos de *M. grisea*. Isto parece explicar a precoce quebra de resistência à brusone das cultivares de arroz irrigado nesta região com apenas um a dois anos de cultivo. A doença constitui-se, portanto, em um dos mais importantes fatores limitantes ao plantio do arroz na região tropical do Brasil.

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de linhagens quase isogênicas de arroz com diferentes genes de resistência à brusone que poderiam ser misturadas para constituir uma cultivar multilinha, conferindo uma maior estabilidade de resistência no campo à população de isolados do patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens resistentes foram obtidas por meio de retrocruzamentos desenvolvidos na Embrapa Arroz e Feijão utilizando como genitores recorrentes as cultivares BRS Formoso e Diamante e a linhagem CNA 8502 e como recorrentes as fontes de resistência à brusone, Oryzica 1, Oryzica Llanos 4, Oryzica Llanos 5, CNAi 9022, CNAi 9025 e 5287. No desenvolvimento das linhagens RC₃, as sementes dos retrocruzamentos foram semeadas em bandejas em casa de vegetação onde as plântulas foram inoculadas com folhas infectadas por brusone coletadas em lavouras comerciais de arroz irrigado de Goiás e Tocantins. Trinta dias após a inoculação, as plantas resistentes foram selecionadas e transplantadas para o campo. Na floração, as plantas fenotipicamente mais semelhantes aos respectivos genitores recorrentes foram retrocruzadas. A estrutura de família dentro de cada população de retrocruzamento foi observada e, desta forma, a progênie de cada planta resistente foi mantida individualizada em cada geração. Foram obtidas 26 linhagens resistentes sendo, 13 oriundas da cultivar BRS Formoso, duas da Diamante e 11 da CNA 8502.

As 26 linhagens resistentes mais quatro testemunhas (Diamante, BRS Formoso, Metica e CNA 8502) foram avaliadas nos Ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) nos anos

agrícolas 2006/07, 2007/08 e 2008/09. O delineamento experimental utilizado foi os blocos ao acaso com quatro repetições e a parcela constituída por oito linhas de 5,0 metros de comprimento. Em 2006/07 o ensaio foi conduzido nos municípios de Goianira e Flores de Goiás, em Goiás e em Formoso do Araguaia e Lagoa da Confusão, no Tocantins. Em 2007/08 e 2008/09 os ensaios foram conduzidos nos mesmos locais de 2006/07 menos Flores de Goiás. Foram coletados dados das seguintes características: produtividade de grãos; floração média; altura de planta; acamamento; incidência de doenças principalmente brusone; rendimento de grãos inteiros e total; teor de amilose; temperatura de gelatinização; notas de comprimento e largura dos grãos e centro branco. Foram realizadas as análises de variância individuais e conjuntas para a característica produtividade de grão em kg ha⁻¹ utilizando o programa Genes (CRUZ, 1997). Devido o ciclo muito longo, a linhagem CNA10896 foi eliminada do segundo ano de VCU e das análises realizadas.

As 35 linhagens e cultivares de arroz sendo, 26 linhagens resistentes, quatro testemunhas (Diamante, CNA 8502, BRS Formoso e Metica 1) e cinco fontes de resistência à brusone (CNAi 9022, Oryzica Llanos 5, Oryzica Llanos 4, Oryzica 1 e 5287), foram inoculadas com as 10 raças mais prevalentes de *Magnaphort grisea* em lavouras comerciais e áreas experimentais dos municípios de Formoso do Araguaia, Lagoa da Confusão e Dueré no Estado do Tocantins, Luis Alves no Estado de Goiás e Paragominas no Pará. As raças utilizadas foram: IA-1, IC-1, ID-1, IA-65, ID-9, IB-1, IA-33, IA-41, IA-9 e IB-41 (DIAS NETO et al., 2008). A inoculação das plantas foi realizada em condições controlada de Casa de Vegetação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra as médias dos dados das linhagens e das testemunhas que se destacaram nos 13 ensaios de VCU conduzidos. Foram detectadas diferenças significativas ao nível de 5% entre as linhagens dentro de anos de avaliação. Entretanto na análise conjunta envolvendo os três anos não se observaram diferenças significativas entre as médias de produtividade de grãos das linhagens. As linhagens oriundas da cultivar BRS Formoso (CNA10901, CNA10902, CNA10903 e CNA10891), de maneira geral, apresentaram elevadas produtividade de grãos, alto rendimento de grãos inteiros e total e após o cozimento os grãos mostram-se soltos e macios (Tabela 1).

As duas linhagens oriundas da cultivar Diamante (CNA10905 e CNA10906) apresentaram comportamento semelhantes quanto as características agrônômicas mas com os grãos após a cocção menos soltos.

A partir da inoculação das dez raças mais prevalentes, observou-se a existência de diferentes reações das linhagens/cultivares avaliadas (Tabela 2). Apenas as cultivares Oryzica Llanos 4 e Oryzica 1 foram resistentes a todas as raças inoculadas. A Oryzica Llanos 5 considerada como fonte de resistência durável a brusone na Colômbia, foi suscetível às raças IA-1, IC-1, IA-41 e IA-9, todas prevalentes em lavouras de arroz irrigado no Estado do Tocantins. A 5287, também considerada fonte de resistência à brusone, foi suscetível a oito das dez raças inoculadas (Tabela 2).

Das linhagens avaliadas, a CNA10901, CNA10902 e CNA10903 oriundas da cultivar BRS Formoso, apresentaram suscetibilidade apenas a raça IC-1, comportando-se como as mais resistentes a brusone na folha. A linhagem CNA10891, também oriunda da BRS Formoso, apresentou resistência a raça IC-1. Isto permitirá com apenas dois componentes (CNA10901+CNA10891, CNA10902+CNA10891, CNA10903+CNA10891) formar multilinhas que proporcionarão resistência as dez raças prevalentes de *M. grisea*.

As duas linhagens, CNA10905 e CNA10906, oriundas da cultivar Diamante, apresentaram o mesmo padrão de resistência e suscetibilidade as dez raças prevalentes de *M. grisea*. (Tabela 2).

¹ Engenheiro Agrônomo, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462 – km 12 – Zona Rural – 75375-000 Santo Antônio de Goiás. E-mail: phrangel@cnpaf.embrapa.br

² Engenheiro Agrônomo, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: ferreira@cenargen.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, Universidade de Brasília. E-mail: justino@hotmail.com

⁴ Engenheiro Agrônomo, Universidade de Brasília. E-mail: liamar@hotmail.com

Tabela 1. Produtividade média de grãos dos três anos, floração média (Flo), altura de planta (Alt), brusone na folha (Bf), escaldadura da folha (Esc), mancha parda (Mp), brusone na panícula (Bp), mancha de grãos (Mg), rendimento de grãos inteiros (Int%) e total (Tot%) e cocção (C) das melhores linhagens resistentes a brusone avaliadas nos anos agrícolas 2006/07, 2007/08 e 2008/9 em vários ambientes de Goiás e Tocantins.

Linhagem	Média	Flo	Alt	Bf	Esc	Mp	Bp	Mg	Int%	Tot%	C
CNA10901	7220	99	97	1	5	6	4	3	56	68	S
Metica 1	7173	105	111	2	3	3	4	3	56	68	S
CNA10902	6926	101	96	1	4	4	3	3	55	66	S
CNA10903	6731	101	102	1	5	5	4	4	59	67	S
CNA10891	6300	103	93	2	4	4	3	3	52	68	S
Formoso	6275	95	101	4	4	4	3	3	57	68	S
Diamante	6045	100	91	2	6	4	4	3	65	70	S
CNA10905	6012	102	88	2	5	4	3	3	62	69	LS
CNA10906	5948	101	94	1	5	4	4	4	62	70	LS
CNA 8502	5739	88	102	6	5	4	5	3	62	68	S
Média	6239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMS - Tukey 5%	2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV%	12,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CONCLUSÃO

As linhagens CNA10901, CNA10902 e CNA10903 oriundas da cultivar BRS Formoso poderão ser misturadas com a CNA10891 constituindo três multilinhas que, em conjunto, condicionarão maior amplitude de resistência à brusone nas lavouras de arroz do estado de Tocantins e Goiás.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cruz, C.D. Programa GENES - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Editora UFV, Viçosa, MG, 442 p, 1997.

DIAS NETO, J.J.; SANTOS, G.R.; DOS ANJOS, L. M.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. Hot spot for diversity of *Magnaphorte oryzae* physiological races in irrigated rice fields in Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.45, n.3, p.252-260, 2010. DIGITE aqui a literatura citada, seguindo as normas da ABNT. Não utilizar abreviações para títulos de periódicos.

Tabela 2. Comportamento das linhagens quanto à resistência as raças prevalentes de brusone

Linhagem	Cruzamento	IA-1	IC-1	ID-1	IA-65	ID-9	IB-1	IA-33	IA-41	IA-9	IB-41
CNA 10901	Formoso/Oryzica Llanos-5////Formoso	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Metica 1	Testemunha	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
CNA 10902	Formoso/Oryzica 1////Formoso	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
CNA 10903	Formoso/5287/Formoso	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
CNA10891	Formoso/CNAi 9022////Formoso	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R
Formoso	Testemunha	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
Diamante	Testemunha	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R
CNA 10905	Diamante/Oryzica Llanos-4/Diamante	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R
CNA 10906	Diamante/5287/Diamante	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R
CNA 8502	Testemunha	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S
CNAi 9022	Fonte resistência à brusone	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R
Oryzica Llanos 5	Fonte resistência à brusone	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R
Oryzica Llanos 4	Fonte resistência à brusone	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Oryzica 1	Fonte resistência à brusone	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5287	Fonte resistência à brusone	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R

R = resistente; S = suscetível

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE ARROZ (*Oryza sativa*) DETERMINADA POR MARCADORES SSR

Jacqueline Barbosa Nascimento¹, Tereza Cristina de Oliveira Borba², Raquel Neves de Mello³, José Alexandre de Freitas Barrigossi⁴, José Francisco da Silva Martins⁵, Paulo Marçal Fernandes⁶

Palavras-chave: marcador molecular, microssatélites e diversidade.

INTRODUÇÃO

O uso de marcadores moleculares em arroz tem possibilitado o estudo da diversidade genética dentro da espécie, a identificação de subespécies, caracterização molecular de cultivares e a construção de mapas para a identificação de características importantes como a resistência a doenças e insetos-praga (LOPES, 2002). Em arroz os marcadores moleculares do tipo SSR estão distribuídos por todo o genoma e possuem um alto conteúdo de informação de polimorfismo. Essa classe de marcadores tem sido utilizada para caracterizar a diversidade genética de cultivares e variedades tradicionais de arroz em alguns países como no Brasil (BRONDANI ET AL., 2006; BORBA ET AL., 2009a) na Argentina (GIARROCCO ET AL., 2007), na Venezuela (HERRERA ET AL., 2008) e na Índia (PERVAIZ ET AL., 2009). Este trabalho teve como objetivo analisar, através de marcadores SSR, a diversidade genética dos acessos de arroz pertencentes à Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 34 acessos de arroz pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão (BAG) e componentes da Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa (CNAE). Os acessos são integrantes dos estratos que compreendem as linhagens e cultivares introduzidas (LCI), linhagens e cultivares brasileiras (LCB) e variedades tradicionais (VT) de arroz denominadas de "Canelas de Ferro". As amostras de tecido foliar de quatro plantas por acesso foram coletadas para a caracterização da diversidade genética a extração e quantificação do DNA genômico foram conduzidas pelo método descrito por Doyle & Doyle (1987) citado por Brondani et al. (2002).

Para a análise molecular foi utilizado um painel composto por 24 marcadores SSR previamente desenvolvidos e publicados na literatura (BORBA ET AL., 2009a). As reações de PCR seguiram o seguinte padrão de amplificação para um volume final de 5 µL: 2,5 µL de Master Mix; 0,5 µL de Q solution; 0,1 µL de água RNase free (Kit comercial Qiagen® Multiplex PCR); 0,8 a 1,0 µL dos primers SSR (10 µM) e 1,0 µL de DNA (3 ng/ µL). O termociclador utilizado para a condução das reações de PCR foi GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e as condições das amplificações seguiram a seguinte programação: uma etapa de 95°C/15 segundos, seguida de 40 ciclos de 94°C/30 segundos, 56°C/90 segundos e 72°C/90 segundos e uma etapa final de 72°C por dez minutos. Os produtos amplificados foram diluídos para a obtenção de sinais uniformes e definidos no

analisador de fragmento automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Os alelos foram identificados pelo software GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems) utilizando o padrão GeneScan™ 500 Rox™ Size Standard (Applied Biosystems).

A determinação do número de alelos exclusivos (ou privados) foi obtida através do programa Genetic Data Analysis (GDA) (LEWIS & ZAYKIN, 2002). O número médio de alelos/locos e os valores de PIC (Polymorphism Information Content) foram calculados utilizando-se o programa PowerMarker versão 3.23 (LIU & MUSE, 2005). O programa Identity (WAGNER & SEFC, 1999) foi usado para obter a probabilidade de identidade (PI). A análise fatorial de correspondência (AFC) foi obtida através do programa Genetix versão 4.03 (BELKHIR ET AL., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 24 marcadores SSR utilizados para a caracterização molecular dos acessos de arroz identificaram 243 alelos variando de quatro (RM 171) a 28 (RM 14), com média de 10,12 alelos/marcador. Entre os alelos identificados, 92 (38%) foram privados ou exclusivos, ou seja, observados em um único acesso (Figura 1). O marcador que detectou o maior número de alelos privados foi o RM 14 com treze alelos (Figura 1). O PIC variou de 0,10 (RM 171) a 0,87 (OG 106), com média de 0,63. O conjunto de marcadores utilizados neste trabalho identificou uma probabilidade de identidade (P.I.) combinada de $1,00 \times 10^{-18}$. Este valor corresponde à probabilidade de se encontrar, ao acaso, dois indivíduos com o mesmo genótipo, quando analisados por um conjunto de marcadores.

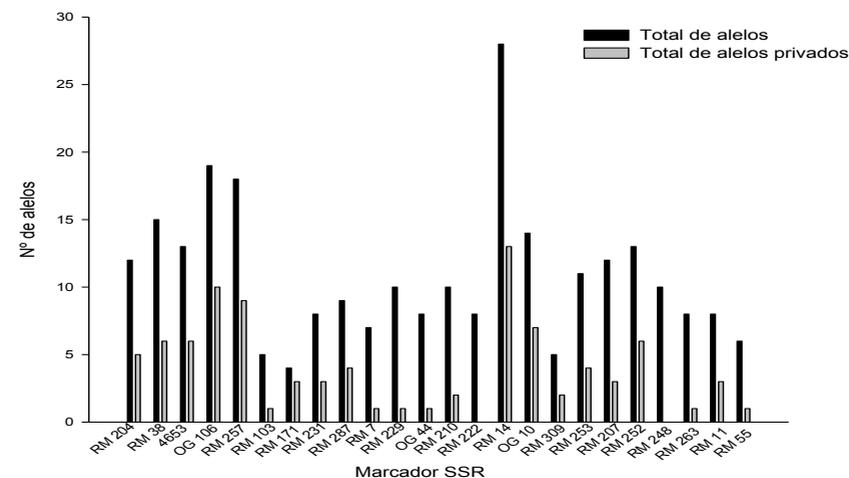


Figura 1. Número de alelos (totais e privados) detectados com 24 marcadores SSR nos diferentes acessos de arroz.

A distribuição espacial da variabilidade genética do conjunto de acessos analisados pode ser visualizada na Figura 2, através da análise fatorial de correspondência (AFC). Verificou-se que as cultivares introduzidas TKM 6 e IR 42 distinguiram-se geneticamente dos demais acessos. As demais cultivares e linhagens introduzidas formaram um grupo com maior similaridade genética entre si, da mesma maneira, as variedades tradicionais e as cultivares brasileiras encontraram-se mais próximas.

¹Doutoranda em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Rodovia Goiânia - Nova Veneza, km zero. Campus Samambaia, Goiânia, GO, nascimentojb@hotmail.com

²Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, tereza@cnpaf.embrapa.br

³Doutora em Agronomia, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, raquelmello@cnpaf.embrapa.br

⁴Doutor em Entomologia Agrícola, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, alex@cnpaf.embrapa.br

⁵Doutor em Entomologia, Pesquisador, Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, martins@cnpaf.embrapa.br

⁶Prof. e Doutor em Entomologia, Universidade Federal de Goiás, Rodovia Goiânia - Nova Veneza, km zero. Campus Samambaia, Goiânia, GO, pmarta@terra.com.br

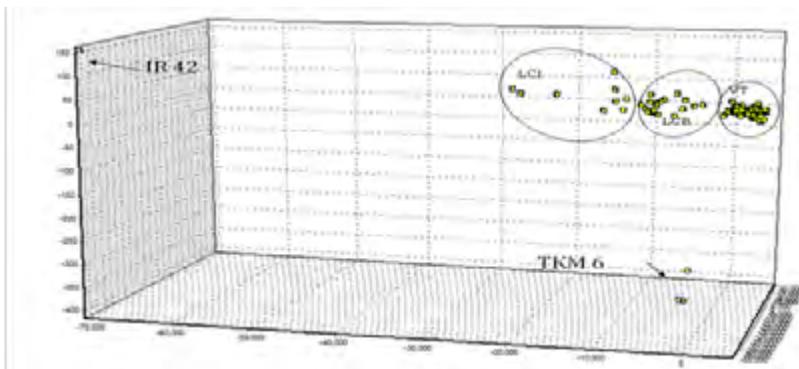


Figura 2. Análise fatorial de correspondência (AFC) demonstrando o padrão de distribuição espacial da variabilidade genética dos 34 acessos analisados.

Em comparação com estudos que analisaram a divergência existente em germoplasma de arroz, o número médio de alelos por loco (10,12) e PIC (0,63) encontrados neste estudo foram superiores aos detectados por Giarrocco et al. (2007) e Pervaiz et al. (2009) que detectaram 8,4 e 4,5 alelos/locos e PIC igual a 0,69 e 0,60, respectivamente. Brondani et al. (2006) e Borba et al. (2009b) encontraram um número médio de alelos por loco de 14,7 e 12,4 e valores de PIC iguais a 0,73 e 0,75, respectivamente. O número de alelos privados encontrado neste trabalho foi superior ao encontrado em Borba et al. (2009a) que obteve 41 alelos privados ou exclusivos. As informações quanto à presença de alelos privados podem ser úteis na identificação de genótipos com variabilidade genética exclusiva, ou seja, com caracteres expressos diferencialmente.

Na análise fatorial de correspondência foi observada a divisão de grupos distintos e este fato pode estar relacionada com a origem dos acessos, já que estes são oriundos de programas de melhoramento de arroz do exterior e do Brasil. A verificação da presença de variabilidade genética expressiva entre os 34 acessos fornece indícios de que estes podem ser utilizados pelos programas de melhoramento do arroz no Brasil como fonte de variabilidade.

CONCLUSÃO

A utilização de marcadores SSR com marcação fluorescente foi bastante eficaz para a análise da diversidade genética dos acessos de arroz avaliados. Essa análise permitiu a identificação de acessos de arroz mais divergentes geneticamente, que poderão ser utilizados como fonte de variabilidade para a ampliação da base genética do arroz melhorado brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. **Genetix** Version 4.05.2. Université de Montpellier. 2001. Disponível em: <<http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>>
- BORBA, T. C. de O.; BRONDANI, R. V.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C. Microsatellite marker-mediated analysis of the Embrapa rice core collection genetic diversity. **Genetica**, v. 137, p.293-304, 2009a.
- BORBA, T. C. de O.; MENDES, C. dos A.; GUIMARÃES, E. P.; BRUNES, T. O.; FONSECA, J. R.; BRONDANI, R. V.; BRONDANI, C. Genetic variability of Brazilian rice landraces determined by SSR markers. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, p.706-712, 2009b.

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 104, p.1192- 1203, 2002.

BRONDANI, C.; BORBA, T. C. de O.; RANGEL, P. N.; BRONDANI, R. P. V. Determination of genetic variability of traditional varieties of Brazilian rice using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p.676-684, 2006.

GIARROCCO, L. E.; MARASSI, M. A.; SALERNO, G. L. Assessment of the genetic diversity in Argentine rice cultivars with SSR markers. **Crop Science**, v. 47, p. 853-860, 2007.

HERRERA, T. G.; DUQUE, D. P.; Almeida, I. P.; Núñez, G. T., Pieter, A. J.; Martinez, C. P.; Tohme, J. M. Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 5, p.1-14, 2008.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0, 2002. Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

LIU, K.; MUSE, S.V. **Power marker**: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics** v.21, p.2128–2129, 2005.

LOPES, M. C. B. **Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de arroz irrigado**. 2002. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

PERVAIZ, Z. H.; RABBANI, M. A.; PEARCE, S. R.; MALIK, S. A. Determination of genetic variability of Asian rice (*Oryza sativa* L.) varieties using microsatellite markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 5641-5651, 2009.

WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. **IDENTITY 1.0**. Center for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna, 1999.