

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

Arthur Tavares de Oliveira Melo¹, Rosana Pereira Vianello Brondani², Priscila Nascimento Rangel², Paulo Hideo Nakano Rangel², João Antônio Mendonça², Claudio Brondani².

Palavras chave: Cruzamento Interespecífico, Introgessão Gênica, Análise de QTL

INTRODUÇÃO

O uso de genitores muito aparentados nos programas de melhoramento, além dos severos efeitos de afinamento 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 e MCCOUCH, 1997). A limitada variabilidade genética de cultivares de arroz resulta em maior vulnerabilidade a pragas e doenças bem como à diminuição da sua capacidade adaptativa a condições ambientais adversas. Por isso, um dos objetivos dos programas de melhoramento modernos de arroz tem sido a busca por novas combinações alélicas em parentes silvestres, uma vez que estes apresentam um *pool* gênico importante que pode ser usado como fonte de resistência para doenças e outras tensões ambientais e características complexas como o rendimento (SWAMY e SARLA, 2008). Pois, este germoplasma silvestre não só pode ser usados como uma fonte de variabilidade, mas também pode contribuir com rendimento de alelos crescente na população (BRONDANI et al., 2002; SWAMY e SARLA, 2008). É neste contexto que as estratégias de AB-QTL permitem a identificação de alelos com efeitos positivos e a utilização de marcadores genéticos em desequilíbrio de ligação com estes QTLs para identificar regiões cromossômicas favoráveis do doador silvestre. Portanto, este trabalho tem como objetivo, executar a caracterização molecular e agrônômica de 114 linhagens de introgessão derivadas do cruzamento interespecífico entre a cultivar elite Cica-8 (*Oryza sativa*) e o acesso silvestre RS-16 (*Oryza glumaepatula*).

MATERIAL E MÉTODOS

A população experimental foi composta por duas populações de retrocruzamentos. Em ambas, a cultivar elite Cica-8 (*Oryza sativa*) foi usada como parental recorrente enquanto que o parental doador foi o RS-16 (*Oryza glumaepatula*), uma espécie diploide, autógena encontrada na América do Sul e Central, coletada na região do rio Negro na bacia amazônica. Na primeira fase do trabalho um total de 186 plantas RC₂F₂ foram coletadas e genotipadas usando-se 149 marcadores moleculares do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) para a construção de um mapa de ligação (RANGEL et al., 2007). Posteriormente, um total de 114 plantas RC₂F₂ foram avançadas até a geração F₉ 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 RC₂F₂ 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 das seguintes características: dias para o florescimento, estatura de planta, número de perfilhos por planta, número panícula por planta e rendimento de grãos de cada planta.

¹ Estagiário da Embrapa Arroz e Feijão e Graduando em Biologia pela Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia – Rod. Goiânia / Nova Veneza, Km 0 - Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia-GO. E-mail: arthurmelobio@gmail.com

² Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO

Na segunda avaliação, as 114 linhagens de introgressão RC₂F₉ foram avaliadas para rendimento de grãos em três localidades no Brasil: Alegrete – RS, Goianira – GO e Boa Vista – RR. 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 RC₂F₂ foram genotipadas com 121 marcadores SSR e 10 ESTs – Sequências Expressas distribuídos ao longo dos 12 cromossomos de arroz (RANGEL et al., 2007). As análises foram conduzidas em gel de agarose 5% corado com brometo de etídio (0.1µg/µL) ou gel de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata. Já as linhagens de introgressão RC₂F₉ foram genotipadas utilizando-se marcadores SSR fluorescentes. A eletroforese foi realizada em um analisador automático de DNA ABI 3100 (Applied Biosystems) e a genotipagem do polimorfismo foi realizada utilizando-se o software GeneMapper versão 3.5 (Applied Biosystems). As proporções introgridas no genoma recorrente da espécie, tanto em famílias RC₂F₂ como em RC₂F₉ foram estimados e os genótipos gráficos foram construídos utilizando o software GGT 2,0 (Van Berloo, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação fenotípica das 114 famílias RC₂F₂ 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 RC₂F₉ 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 no experimento realizado para famílias RC₂F₂. Na comparação de produtividade entre as famílias RC₂F₂ e RC₂F₉ 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.)

Tabela 1: Produtividade média de grãos e proporção de introgressão de nove linhas altamente produtivas nas gerações RC₂F₂ e RC₂F₉ nos respectivos locais de avaliação. Os números em negrito representam a produtividade média superior em relação a cultivar Cica-8 em cada local.

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

A caracterização molecular da geração RC₂F₂ foi realizada através de 121 marcadores SSRs e 10 ESTs distribuídos ao longo dos 12 cromossomos do arroz cobrindo 1.636,7 cM do genoma e com uma distância média de 12,5 cM entre os locos analisados. O número de segmentos introgridos em heterozigose contendo alelos selvagens variou de três (planta 112) a 23 (planta 68), com uma média de 10 segmentos introgridos por planta. Já a geração RC₂F₉ foi genotipada usando-se 60 marcadores SSR também distribuídos uniformemente ao longo dos 12 cromossomos do arroz, abrangendo 1.594,6 cM do genoma total e com uma distância média de 26,6 cM entre os marcadores. O número médio de fragmentos selvagens introgridos foi de 11,5 variando de 6 (planta 47) a 19 (plantas 60 e 114). A média de fragmentos em homozigose introgridos foi de 9,1% variando de zero a 34,3% (planta 60), já 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 realizadas utilizando-se 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 RC₂F₂ foram detectados 18 marcadores na análise de SMA e nove na análise 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, respectivamente. Relata-se que o EST20 foi desenvolvido de uma sequência expressa da enzima xiloglucano endotransglicosilase (XET) que atua no crescimento de parede celular (RANGEL, et al., 2007). O mapeamento de um único marcador (SMA) detectou sete marcadores associados à produtividade nos três locais de avaliação da família RC₂F₉. O loco 4879 no cromossomo 4, que foi associado à produtividade em Alegrete, Rio Grande do Sul. O marcador RM01, no cromossomo 1, detectado pela análise SMA para o experimento conduzido 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 – RR. Estes QTLs, foram localizados no cromossomo 2 (OG17 – RM263) e 4 (4879 – EST20) explicando assim proporções elevadas da variação fenotípica observada (53,72% e 44,47% respectivamente). O QTL associativo para rendimento encontrado no cromossomo 4 foi também detectado nas famílias RC₂F₂ na análise CIM.

Pode-se inferir que a observação de segregação transgressiva para rendimento em uma geração, como em RC₂F₉, pode não ser resultado da heterose, mas sim de alelos selvagens complementares a alelos de vários locos do parental recorrente. Este fato pode explicar o aumento do número de perfilhos, panículas 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 RC₂F₉ (27, 46, 62, 86, 88, 106 e 110) mostraram estabilidade de rendimento entre os locais avaliados, além de apresentarem também proporções baixas de introgressão, 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. Desta forma, sugere-se 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 RC₂F₂ quanto em RC₂F₉, através da ação complementar de alelos silvestres, é de grande interesse. Isto 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 RC₂F₂ para RC₂F₉ sem seleção, os efeitos positivos sobre a produtividade dos fragmentos silvestres introgridos foram mantidos com sucesso através das gerações. Nas plantas RC₂F₉ houve uma média de introgressão em heterozigose de 3,2%. Estes valores podem ser considerados baixos se comparados com TIAN et al. (2006), que caracterizaram a introgressão de segmentos de 214 RC₄F₄ de linhagens do cruzamento de *O. sativa* e *O. rufipogon* e observaram uma média de 38,4% de segmentos heterozigóticos. Sugere-se, desta forma, que o baixo nível de polinização cruzada esperada em arroz e, conseqüentemente, o 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 produtividade de grãos na geração RC₂F₉, explicou alta proporção da variação fenotípica (44,47%). Este fato indica que esta região possui um grande impacto sobre a produtividade em populações interespecíficas, determinando que o EST20 se comporta como um forte candidato para seleção assistida por marcadores (SAM). O marcador RM01 também pode ser considerado como marcador candidato para SAM, pois este apresentou ligação a um QTL para produtividade nas linhagens de introgressão RC₂F₉, nas linhagens interespecíficas derivadas do cruzamento de BG90-2 x RS-16 (RANGEL et al., 2008), além da geração RC₂F₂ (BRONDANI et al., 2002)

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram a existência de nove linhagens de introgressão com alta produtividade em diferentes anos, diferentes locais e diferentes gerações (RC₂F₂ e RC₂F₉). Logo, estas estão disponíveis aos programas de melhoramento de arroz para desenvolvimento de novas cultivares ou para novos experimentos que visem a avaliação de outras características economicamente importantes, tais como estresses bióticos e abióticos. Dois marcadores (EST20 – cromossomo 4 e RM01 – cromossomo 1) apresentam ligação com QTLs para produtividade. Sugere-se que estes marcadores possam ser candidatos a SAM após estudos mais refinados.

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.