



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Utilização da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* como doadora de alelos para aumento da produção e da tolerância à seca do arroz (*Oryza sativa*) via análise de AB-QTLs.

Priscila Nascimento Rangel

Orientadora: Dra. Rosana Pereira Vianello Brondani

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia, área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Goiânia

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, meu porto seguro, ao meu pai, meu grande exemplo, à minha avó, grande incentivadora e ao meu avô, que demonstrava seu amor da melhor maneira possível: com chocolates.

AGRADECIMENTOS

A Deus. A crença na sua presença e proteção me deu coragem para atravessar os momentos difíceis e alegria para aproveitar os momentos felizes.

Ao meu marido pelo apoio e suporte em todos os momentos.

À minha família pelo apoio e suporte em todos os momentos.

Aos amigos queridos do laboratório de biotecnologia. Todos, à sua maneira, foram um pouco responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional e me incentivaram para a conclusão desse trabalho.

À Universidade Federal de Goiás, à Embrapa Arroz e Feijão e ao Generation Challenge Program pelo apoio financeiro e pelas condições de trabalho.

À Gerusa, pela amizade, cooperação e pela competência na realização dos cruzamentos e desenvolvimento das populações interespecíficas utilizadas neste trabalho.

Ao João Antônio pela cooperação e pela eficiente colaboração nos trabalhos de campo e avaliações fenotípicas das populações interespecíficas.

Ao Dr. Cleber Guimarães pelo suporte e coordenação das avaliações para tolerância à seca.

Um agradecimento especial aos meus queridos orientadores Rosana e Claudio. Vocês são os grandes responsáveis pelo meu crescente interesse pela carreira científica e me ensinaram mais do que imaginam. Obrigada pelas oportunidades maravilhosas que me concederam e por acreditarem em mim. É uma grande felicidade tê-los como mestres e amigos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO GERAL.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO GERAL.....	14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 IMPORTÂNCIA DO ARROZ.....	15
3.2 MECANISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO.....	16
3.3 O ARROZ E O ESTRESSE HÍDRICO.....	22
3.4 O GÊNERO ORYZA.....	26
3.5 O GENOMA DO ARROZ.....	32
3.6 MARCADORES MOLECULARES EM ARROZ.....	36
3.7 MAPEAMENTO DE QTLs E A OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE INTROGRESSÃO.....	40
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
5 ARTIGO 1.....	62
ABSTRACT.....	63
5.1 INTRODUCTION.....	64
5.2 MATERIALS AND METHODS.....	65
5.2.1 Development of the introgression lines (ILs).....	65
5.2.2 Phenotypical evaluations.....	66
5.2.3 Molecular markers assay.....	66
5.3 RESULTS.....	67
5.3.1 Phenotypic evaluation of ILs.....	67
5.3.2 Molecular characterization of ILs.....	68
5.4 DISCUSSION.....	69
5.5 BIBLIOGRAPHY.....	79
6 ARTIGO 2.....	82
ABSTRACT.....	83
6.1 INTRODUCTION.....	84
6.2 MATERIAL AND METHODS.....	87
6.2.1 Experimental population.....	87
6.2.2 Field trial.....	87
6.2.3 Molecular markers assay.....	89
6.2.4 QTL analysis.....	90
6.3 RESULTS.....	90
6.3.1 Phenotypic variation and traits correlations.....	90
6.3.2 Linkage map construction and QTL mapping.....	91
6.4 DISCUSSION.....	94
6.4.1 Field evaluation.....	94
6.4.2 Linkage map construction and QTL mapping.....	97
6.4.3 Contribution of <i>Oryza glumaepatula</i> alleles to drought tolerance.....	100
5.5 BIBLIOGRAPHY.....	116
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121

LISTA DE TABELAS

Table 1. Grain yield (kg/ha) obtained in the trails conducted in the season 2003/04 in five locations: Goianira, State of Goias, Itajai, State of Santa Catarina, Formoso do Araguaia, State of Tocantins, Alegrete, State of Rio Grande do Sul and Boa Vista, State of Roraima, Brazil. The number of wild fragments and proportions of homozygous and heterogeneous fragments in the high yielding introgression lines are shown.....	73
Table 2. QTLs detected for trait grain yield in 35 RC ₂ F ₈ rice introgression lines with wild genomic fragments. QTLs were detected under the minimum threshold of p<0.05 in three locations: Goianira (State of Goias), Boa Vista (State of Roraima) and Formoso do Araguaia (State of Tocantins), Brazil. PV is the phenotypic variation explained by each marker.....	74
Supplemental Table 1. Microsatellite markers used for the molecular characterization of the 35 Introgression Lines. Markers fluorescence labels are Fam (6-carboxifluorescein) and Hex (hexachloro-6-carboxifluorescein).....	75
Table 1. Traits mean values and ranges of the BC ₂ F ₂ families (BRSMG Curinga X GEN1233) and two controls (BRSMG Curinga and BRS Soberana) evaluated in fully irrigated (non-stress) and water stress (stress) treatments. Standard deviations (SD) and coefficients of variation (CV) are shown.....	104
Table 2. Phenotypic (P), genotypic (G) and environmental (E) correlations coefficients (r) estimated between eight traits measured in fully irrigated (non-stress – N) and water stress (stress – S) treatments. Traits abbreviations are described at the Materials and Methods section.....	105
Table 3. QTLs detected by composite interval mapping for eight traits measured in 142 BC ₂ F ₂ families from the inter-specific cross <i>O. sativa</i> (BRSMG Curinga) X <i>O. glumaepatula</i> (GEN1233) evaluated under fully irrigated (non-stress – N) and water stress conditions (stress – S). Marker interval is the interval that spanned the QTL according to the composite interval mapping. Interval range, in base pairs, was given by the marker search tool at Gramene web site (www.gramene.org), as well as peak positions, in base pairs. LOD score are the minimum threshold for QTL detection determined for 1,000 permutations. The allele source designates which parents' alleles increased the traits means and Add is the additivity that is the numerical representation if this increase. R ² is the proportion of phenotypic variation explained by each QTL.....	107
Table 4. Transcripts identified at markers on the peaks of QTL intervals that are shown in Table 3.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Graphical genotypes of the 35 introgression lines showing the 12 rice chromosomes. Blue squares represent the recurrent parent (*Oryza sativa*) proportion of the genome. Yellow squares represent the wild (*Oryza glumaepatula*) homozygous introgressions, red squares are the heterogeneous introgressions and gray squares represent missing data. SSR markers distributions on each chromosome are shown.....79

Figure 1. Histograms representing frequencies distributions of eight traits measured in fully irrigated (non-stress (N) – blue columns) and water stress (stress (S) – red columns) treatments for 142 BC₂F₂ families from the inter-specific cross *O. sativa* (BRSMG Curinga) X *O. glumaepatula* (GEN1233). Black arrows indicate the recurrent parent (BRSMG Curinga) means for each trait. Y-axis represent the frequencies varying from zero to 30 and X-axis represent the means for each trait.....112

Figure 2. Molecular linkage map of the *O. sativa* (BRSMG Curinga) X *glumaepatula* (GEN1233) inter-specific population. Marker distances are expressed in centimorgans. Distorted markers are indicated with an asterisk. MITE-markers are in bold. Mapped QTLs are shown in Table 4. QTLs legends are shown. Filled symbols represent QTLs detected in non-stress treatment and unfilled symbols represent QTLs detect in stress treatment.....113

Figure 3. Graphical genotypes of 142 BC₂F₁ plants from the inter-specific cross *O. sativa* (BRSMG Curinga) X *O. glumaepatula* (GEN1233) from chromosomes 4, 5, 11 and 12. Blue bars show the proportion of the genome that correspond to homozygous fragments from BRSMG Curinga, yellow bars show wild heterozygous introgressions (BRSMG Curinga/GEN1233) and red bars represent missing data.....114

RESUMO GERAL

O aumento da produção de arroz nas áreas agricultáveis já disponíveis e com uma utilização mais racional dos recursos hídricos é uma necessidade devido à crescente preocupação ambiental. O aumento da variabilidade genética das linhagens e cultivares dos programas de melhoramento é a melhor alternativa para o aumento dos ganhos genéticos e para a obtenção de novas cultivares mais produtivas e mais tolerantes a estresses bióticos e abióticos. Parentes silvestres da espécie cultivada de arroz (*Oryza sativa*) vêm sendo utilizados como fonte de alelos para o aumento da variabilidade e da produção de linhagens e cultivares. O objetivo geral deste trabalho de tese foi avaliar a contribuição da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* como doadora de alelos em dois cruzamentos interespecíficos via análises de AB-QTLs: o primeiro, correspondente ao Artigo 1, estudou o aumento de produção no sistema de cultivo irrigado, e o segundo, correspondente ao Artigo 2, estudou o aumento da produção sob condição de estresse de seca. O Artigo 1 (“Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the inter-specific cross *Oryza sativa* (BG 90-2) x *Oryza glumaepatula* (RS-16)”) teve como objetivo caracterizar linhagens de introgressão (ILs) do cruzamento interespecífico utilizando um acesso silvestre coletado na Bacia Amazônica. Um total de 35 ILs foram avaliadas em três locais durante o período de cultivo 2002/03 e as 15 linhagens mais produtivas neste ensaio foram avaliadas no período 2003/04 em cinco locais. Em 2003/04 seis ILs (CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi 9935, CNAi 9936 and CNAi 9937) apresentaram as maiores médias de produção e foram estatisticamente superiores aos controles Metica 1 e IRGA 417. A caracterização molecular das 35 ILs foi feita com 92 marcadores microssatélites distribuídos nos 12 cromossomos do arroz e uma análise de QTLs usando regressão simples foi feita utilizando os dados fenotípicos coletados em 2002/03. As seis ILs mais produtivas apresentaram uma baixa proporção de fragmentos silvestres introgrididos. Um total de 14 marcadores moleculares foram associados a QTLs nos três locais. As seis ILs mais produtivas foram disponibilizadas ao programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão e a linhagem CNAi 9930 está sendo recomendada para cultivo porque além da alta produção, tanto no cultivo principal quanto na rebrota, apresentou boa qualidade de grãos e bom rendimento de engenho. As ILs derivadas da *O. glumaepatula* RS-16 provaram ser uma fonte importante de novos alelos para o desenvolvimento de cultivares de arroz mais produtivas. O Artigo 2 (“Identification of QTLs for yield-related traits and drought tolerance in introgression lines from the cross *Oryza sativa* (BRSMG Curinga) X *Oryza glumaepatula* (GEN1233)”) teve como objetivo mapear QTLs para características relacionadas à produção sob estresse hídrico avaliadas numa população de retrocruzamento utilizando um acesso de *O. glumaepatula* coletado no Cerrado. Um total de 59 famílias RC₁F₁

foram usadas para a construção de um mapa de ligação com 157 marcadores moleculares (133 microssatélites e 24 marcadores MITEs) que apresentou uma cobertura de 1.721,47cM do genoma do arroz e uma distância média entre marcadores de 10,9cM. 142 famílias RC₂F₂ derivadas deste cruzamento foram avaliadas para características de produção sob dois tratamentos, um sob condições ideais de irrigação e outro sob estresse hídrico. Oito QTLs foram identificados nos dois tratamentos, sendo quatro no tratamento sem estresse para as características fertilidade de espiguetas, número de perfilhos, altura de planta e peso de 100 grãos e quatro no tratamento com estresse para as características produção, fertilidade de espiguetas, número de perfilhos e número de panículas. Os alelos silvestres contribuíram positivamente para as características número de perfilhos e peso de 100 grãos no tratamento sem estresse e número de perfilhos e número de panículas no tratamento com estresse. Segregantes transgressivos foram identificados para número de grãos por panícula, número de perfilhos, número de panículas e peso de 100 grãos, mostrando que os alelos silvestres contribuíram para a estabilidade de produção e vigor de planta na população. Os resultados desse trabalho demonstram que a exploração da *O. glumaepatula* nos programas de melhoramento é uma estratégia importante para o aumento da variabilidade genética do arroz cultivado e para a busca por novos alelos para a tolerância a outros estresses. Com base em todos os resultados acumulados até o momento envolvendo cruzamentos interespecíficos do arroz com a espécie silvestre *O. glumaepatula*, recomenda-se a utilização contínua de indivíduos das populações coletadas e armazenadas no Banco de Germoplasma como genitores, com a finalidade de serem identificadas novas combinações alélicas que produzam progênes transgressivas em relação aos genitores elite de arroz.

ABSTRACT

The increase of rice production in existing arable land with a more rational utilization of water resources is a need because of the growing concern with the environment. Increasing the genetic variability of lines and cultivars of breeding programs is the best alternative to increase the genetic gains and to obtain high yielding cultivars that are more tolerant to biotic and abiotic stresses. Wild relatives of cultivated rice (*Oryza sativa*) have been used as a source of alleles to increase the variability and grain yield of lines and cultivars. The objective of this thesis was to evaluate the contribution of the wild species *Oryza glumaepatula* as a donor of alleles to increase grain yield and drought tolerance in two inter-specific crosses using the AB-QTL analysis: the first, that corresponds to Article 1, studied yield enhancement in irrigated paddy rice, e the second, that corresponds to Article 2, studied yield enhancement under water stress. The objective of Article 1 (“Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the inter-specific cross *Oryza sativa* (BG 90-2) x *Oryza glumaepatula* (RS-16)”) was to characterize introgression lines (ILs) from an inter-specific cross using a wild accession that was collected in the Amazon Basin. A total of 35 ILs were field evaluated in the season 2002/03 in three locations and the 15 best performed ones were evaluated in the season 2003/04 in five locations. In 2003/04 six ILs (CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi 9935, CNAi 9936 and CNAi 9937) showed the highest yield means and were statistically superior to the controls Metica 1 and IRGA 417. Molecular characterization of the 35 ILs was performed with 92 microsatellite markers distributed on the 12 rice chromosomes and a simple regression QTL analysis was performed using the phenotypic data from 2002/03. The six high-yielding ILs showed a low proportion of wild fragment introgressions. A total of 14 molecular markers were associated to QTLs in the three locations. The six high-yielding ILs were incorporated in Embrapa’s breeding program and the line CNAi 9930 is recommended for cultivation due to additional advantages of good grain cooking and milling qualities and high yield stability. The *O. glumaepatula* RS-16-derived ILs proved to be a source of new alleles to the development of high-yielding rice cultivars. The objective of Article 2 (“Identification of QTLs for yield-related traits and drought tolerance in introgression lines from the cross *Oryza glumaepatula* X *Oryza sativa*”) was to map QTLs for yield-related traits evaluated under water stress in a backcross population derived from a cross using a wild accession that was collected in the Cerrado Biome. A total of 59 BC₁F₁ families from the cross between the wild accession GEN1233 and the upland cultivar BRSMG Curinga were used to construct a linkage map with 157 molecular markers (133 microsatellites and 24 MITE-markers) that covered 1,721.47cM of the rice genome with an average marker distance of 10.9cM. 142 BC₂F₂ families derived from

this cross were evaluated in experimental field under two conditions, one fully-irrigated and one under water stress, for yield-related traits. Eight QTLs were detected on both conditions, from which four were detected on the fully irrigated treatment and four were detected under water stress. In the non-stress treatment QTLs were detected for traits spikelet fertility (SF), tiller number (TLN), plant height (PLH) and 100 grain weight (100GW) and in the stress treatment QTLs were detected for traits yield (YLD), spikelet fertility (SF), tiller number (TLN) and panicle number (PANN). The wild alleles had positive effects on the traits TLN and 100GW in non-stress and TLN and PANN in stress. Transgressive segregants, showing better performance than the cultivated parent, were identified for traits GPP, TLN, PANN and 100GW, showing that the wild alleles contributed to yield stability and plant vigour in this population. The results of these works show that the exploitation of *O. glumaepatula* in breeding programs is an interesting strategy to increase the genetic variability of cultivated rice and for the search of new alleles related to other stresses tolerance. Based on the results from the studies involving inter-specific crosses with the wild *O. glumaepatula*, the continuous use of accessions from the populations collected and kept in the Germplasm Bank is recommended, aiming to obtain new allelic combinations that allow the identification of transgressive segregants in relation to rice elite genitors.

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é a principal fonte de nutrientes para mais de metade da população mundial, sendo que a sua importância é mais evidenciada em países pobres e em desenvolvimento, onde ele é a base da dieta e principal fonte de proteínas e carboidratos. As cultivares modernas de arroz são resultado de um longo processo de seleção artificial que favoreceu algumas características que facilitavam o seu cultivo, tais como adesão das sementes à panícula, hábito de crescimento compacto e perda da inibição da germinação (Tanksley & McCouch, 1997), o que levou a uma considerável perda de alelos e diminuição da variabilidade genética da espécie quando comparada aos seus parentes silvestres. Além disso, os programas de melhoramento geralmente utilizam as mesmas linhagens adaptadas como parentais nos processos de obtenção de novas cultivares, o que provoca um estreitamento da sua base genética, podendo diminuir os ganhos genéticos e torná-las susceptíveis a estresses bióticos e abióticos. As espécies silvestres de arroz vêm sendo utilizadas como fonte de alelos para o aumento da variabilidade e da produção do arroz cultivado, tais como *Oryza rufipogon* (McCouch et al., 2007), *Oryza glumaepatula* (Brondani et al., 2002) e *Oryza glaberrima* (Segman et al., 2007). No entanto, a utilização deste germoplasma é muitas vezes limitada porque espécies silvestres possuem características indesejáveis aos programas de melhoramento que poderiam resultar em alteração da arquitetura de planta e redução da produtividade das cultivares modernas.

A exploração do potencial de espécies silvestres em cruzamentos amplos nos programas de melhoramento pode ser facilitada pela grande disponibilidade de ferramentas moleculares. O sequenciamento completo do genoma do arroz abriu a possibilidade para a busca por marcadores moleculares capazes de amostrar virtualmente qualquer região do genoma. Os marcadores podem ser usados para mapear o genoma do arroz e, dessa forma, permitir a busca por regiões específicas de interesse. Em um cruzamento interespecífico, a utilização de marcadores moleculares para a construção de um mapa de ligação permite a identificação de associações entre as marcas no mapa e características quantitativas avaliadas na população segregante (QTLs – Quantitative Trait Loci) e de regiões que foram introgrididas do parental silvestre. Isso, por sua vez, permite o monitoramento das introgressões silvestres e o estabelecimento de uma relação entre essas introgressões e as características quantitativas de interesse. As regiões introgrididas que apresentam efeitos positivos nessas características podem ser mantidas na população através de seleção assistida por marcadores,

gerando linhagens de introgressão (ILs – Introgression Lines) contendo fragmentos silvestres de interesse no background genético do parental cultivado. ILs representam um reservatório de alelos silvestres que pode ser mais facilmente utilizado nos programas de melhoramento, pois possuem pequenos fragmentos silvestres distribuídos no genoma do arroz cultivado e podem ser facilmente avaliadas e caracterizadas.

O aumento da produção de arroz é uma preocupação constante, que nos últimos anos vem sendo acompanhada da necessidade de se utilizar as áreas cultiváveis já disponíveis e de se utilizar a água com mais racionalidade na irrigação, devido à crescente necessidade de preservação do meio ambiente. A irrigação consome 70% da água potável do planeta (Chaves & Oliveira, 2004) e a diminuição dos recursos hídricos é uma realidade crescente devido ao aumento da poluição e à competição com o consumo industrial e urbano. A demanda por água no cultivo do arroz irrigado em várzea pode chegar a 2.000 litros para a produção de 1kg de arroz (Embrapa, 2005), mas essa demanda diminui no sistema de cultivo de terras altas, especialmente em regiões onde as chuvas são bem distribuídas. No entanto, em regiões onde as chuvas são escassas ou irregulares a necessidade da irrigação artificial pode ser um fator limitante para o seu cultivo. O desenvolvimento de cultivares de arroz de terras altas mais tolerantes à seca é uma das alternativas para o aumento da produção e racionalização do uso da água na irrigação. Entretanto, esse é um processo trabalhoso e cujo sucesso depende, entre outros fatores, da existência de variabilidade no conjunto gênico do arroz. A obtenção de novas cultivares mais produtivas e mais tolerantes a estresses bióticos e abióticos pelos programas de melhoramento é feita pela recombinação dos alelos nos locos de linhagens que se destaquem para as características alvo, seguida pela seleção, na população segregante proveniente deste cruzamento, dos genótipos que apresentem desempenho superior para as características avaliadas. A existência de variabilidade genética para as características de interesse aumenta as chances de serem encontrados genótipos que se destaquem.

A *Oryza glumaepatula* é uma das quatro espécies silvestres encontradas no Brasil e cujo potencial como doadora de alelos para características relacionadas à produção vem sendo explorado (Brondani et al., 2002; Rangel et al., 2005). Esta espécie autógama e que possui genoma AA é encontrada nas Américas Central e do Sul e no Brasil é encontrada na Amazônia, no Pantanal Matogrossense e em bacias hidrográficas dos Estados de Goiás, Tocantins e Roraima. Em seu habitat natural a *O. glumaepatula* pode ocupar regiões alagáveis nas margens de rios ou áreas de várzea longe do leito dos rios, sendo que as seu ciclo de vida se dá pela germinação das sementes durante o

período de seca, quando o volume dos rios ou da várzea diminui, seguida pelo crescimento rápido das plantas tão logo o período das chuvas se inicia. A *O. glumaepatula* é adaptada às condições de solo e clima tropicais e seu potencial como fonte de alelos de tolerância a estresses bióticos e abióticos ainda precisa ser explorado. Esta Tese de Doutorado teve como principal objetivo avaliar a contribuição da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* como doadora de alelos para aumento de produção em dois cruzamentos interespecíficos, o primeiro em experimento conduzido no sistema de cultivo irrigado utilizando famílias RC₂F₈ (*O. sativa* RS-16 x *O. sativa* BG90-2), correspondendo ao Artigo 1, e o segundo conduzido no sistema de cultivo de sequeiro com e sem estresse de seca utilizando famílias RC₂F₂ (*O. glumaepatula* GEN1233 x *O. sativa* BRSMG Curinga), correspondendo ao Artigo 2. O Artigo 1 conclui o trabalho pioneiro de cruzamentos interespecíficos com *O. glumaepatula* no Brasil que foi iniciado no ano de 1996, e o Artigo 2 apresenta parte dos resultados obtidos por um projeto internacional financiado pelo *Generation Challenge Program*, cujo objetivo principal é o desenvolvimento de linhagens interespecíficas oriundas de quatro espécies silvestres de *Oryza*: *O. glumaepatula*, *O. barthii*, *O. rufipogon* e *O. glaberrima*.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a contribuição da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* como doadora de alelos em dois cruzamentos utilizando o método de AB-QTLs. No primeiro cruzamento, utilizando um acesso silvestre coletado na Bacia Amazônica (RS-16) e uma linhagem *O. sativa* de cultivo irrigado (BG90-2), realizar as caracterizações agrônômica e molecular de 35 linhagens de introgressão e avaliar a contribuição dos alelos silvestres para produção. No segundo cruzamento, utilizando um acesso coletado no Cerrado (GEN1233) e uma cultivar de terras altas BRSMG Curinga, avaliar a contribuição dos alelos silvestres para a tolerância à seca.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar 35 linhagens de introgressão do programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão derivadas do cruzamento *O. sativa* (BG90-2) X *O. glumaepatula* (RS-16) utilizando marcadores moleculares microssatélites.
2. Relacionar os dados moleculares das 35 linhagens com os dados obtidos pela sua avaliação fenotípica realizada em cinco locais para a característica produção de grãos.
3. Identificar as linhagens mais produtivas e avaliar a contribuição dos alelos silvestres no background genético dessas linhagens.
4. Construir um mapa de ligação na população RC₁F₁ do cruzamento *O. sativa* (BRSMG Curinga) X *O. glumaepatula* (GEN1233) utilizando marcadores moleculares microssatélites e marcadores baseados em polimorfismo de presença ou ausência (indel) de transposons no genoma do arroz (MITES).
5. Avaliar uma população de 142 famílias RC₂F₂ em campo experimental para características relacionadas à produção em condições ideais de cultivo (sob irrigação) e sob estresse hídrico.
6. Mapear QTLs relacionados à produção e a componentes de produtividade avaliados sob irrigação e sob estresse hídrico.
7. Avaliar a contribuição dos alelos silvestres, provenientes da *O. glumaepatula*, para a tolerância à seca no background genético da cultivar de arroz de terras altas BRSMG Curinga.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DO ARROZ

Existem aproximadamente 10.000 espécies de gramíneas distribuídas e adaptadas a quase todos os ambientes terrestres. Gramíneas são espécies dominantes em vários dos maiores ecossistemas do planeta, como, por exemplo, as savanas africanas e os pampas da América do Sul, mas a sua importância se deve principalmente ao fato de que algumas espécies, principalmente o milho, o arroz e o trigo, compõem a base da alimentação da maior parte da população mundial (Vaughan et al., 2005). Entre essas gramíneas, o arroz constitui a principal fonte de nutrientes para cerca de dois terços da população mundial, especialmente em países em desenvolvimento, onde aproximadamente 90% da produção total é consumida localmente (Maclean et al., 2002; Vaughan et al., 2003). A produção e consumo do arroz na Ásia representam mais de 90% da produção mundial e em todos os países produtores ele é a base da alimentação, fornecendo de 50 a 80% das calorias diárias para a população daquela região. Em países pobres como Bangladesh e Vietnã o consumo do arroz supre 65% da necessidade diária de energia e 60% da necessidade de proteína (Maclean et al., 2002). No Brasil, essas proporções representam 14% da energia e 10% da proteína consumidas pela população diariamente (Naves & Bassinello, 2006). O arroz polido, forma como este cereal é mais consumido em todo o mundo, apresenta perdas consideráveis de fibras, lipídios e vitaminas quando comparado ao arroz integral, mas ainda assim é uma importante fonte de nutrientes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que uma dieta saudável deve conter mais de metade de sua energia proveniente dos carboidratos e apenas 30%, no máximo, proveniente de lipídios (Naves & Bassinello, 2006). Sob este ponto de vista o arroz é um alimento importante, pois apresenta em sua composição 80% de carboidratos, representados na sua quase totalidade pelo amido, e apenas 0.5% de lipídios (Naves & Bassinello, 2006).

Os principais países produtores de arroz são, em ordem decrescente, China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil, Japão e Estados Unidos (FAO, 2003). A produção de arroz em casca na Ásia no ano de 2006 foi muito maior que a de outros continentes, ficando em torno de 577 milhões de toneladas, sendo que apenas a China produziu 184 milhões de toneladas (FAO, 2006). No Brasil, a produção de arroz em casca na safra 2005/06 foi de 11,5 milhões de toneladas, sendo 12,6% menor que a safra do ano anterior, enquanto que na safra 2006/07 a

produção se manteve estável em 11,3 milhões de toneladas (Embrapa, 2007; IBGE, 2007). O arroz é cultivado em todos os estados do Brasil e no Distrito Federal, mas os principais estados produtores são Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo que a produção do primeiro corresponde a 58% da produção nacional. Segundo Guimarães et al. (2006) a produção mundial de arroz aumentou 1.09%, enquanto que a população cresceu 1.32% e o consumo 1.27%. Ainda de acordo com esses autores, a América Latina e a África são as únicas regiões com potencial para suprir essa demanda, pois possuem grande parte das terras agricultáveis e dos recursos hídricos do planeta. Um exemplo do potencial de expansão agrícola do Brasil é a ocupação do Cerrado, que teve início na década de 60 (Embrapa, 2003). Desde então, diversas culturas passaram a ser cultivadas no Cerrado e os programas de melhoramento passaram a focar o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas ao clima e solo da região.

No Brasil, arroz é cultivado sob dois tipos de sistemas, o de várzeas, irrigado por inundação controlada, e o de terras altas, que engloba o sem irrigação (dependente de chuvas) e o com irrigação artificial (Guimarães et al., 2006). No sistema de várzeas a lavoura é inundada logo após a emergência das plantas e uma lâmina de água é mantida até a época da colheita. Nesse sistema a quantidade de insumos requerida é menor que no terras altas, principalmente porque a incidência de ervas-daninhas é muito menor devido à inundação. No entanto, a demanda de água é grande, podendo chegar até 2.000 litros para a produção de 1kg de grãos em casca (Embrapa, 2005). A região Centro-Oeste é a mais importante no cultivo do arroz de terras altas, sendo que predominam os Latossolos, que apresentam boas características físicas, mas baixa fertilidade natural (Guimarães et al., 2006). As cultivares sob sistema de terras altas estão submetidas a condições bastante diferentes daquelas de várzea no que diz respeito tanto à presença de oxigênio no solo quanto à disponibilidade de água e competição com ervas-daninhas. De uma maneira geral, cultivares de terras altas apresentam raízes longas e espessas, enquanto que as de várzea apresentam raízes finas e fibrosas. Além disso, as plantas de terras altas apresentam folhas mais curtas, estreitas e eretas, o que leva a uma baixa cobertura inicial do terreno e, conseqüentemente, a uma menor competitividade com plantas daninhas quando comparadas às cultivares antigas de terras altas.

3.2 MECANISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO

O déficit hídrico é um fator limitante para a produção de arroz, especialmente sob sistema de terras altas, onde a disponibilidade de água depende das chuvas ou da irrigação artificial. Aproximadamente 70% de toda a água potável do planeta é utilizada em irrigação (Chaves & Oliveira, 2004), situação que não pode ser sustentada durante muito tempo frente às crescentes restrições ao seu uso indiscriminado devido a questões ambientais. Liu et al. (2004) afirmam que a disponibilidade de água para irrigação artificial deve se tornar cada vez mais reduzida devido aos crescentes índices de poluição dos mananciais do planeta e à competição com o consumo urbano e industrial. Segundo Lafitte et al. (2006), mesmo na Ásia, onde tradicionalmente o arroz é cultivado sob sistema irrigado em várzeas, o aumento da população e a crescente urbanização têm levado a uma significativa redução da disponibilidade de água para irrigação. Segundo Nguyen et al. (1997), o maior desafio para os programas de melhoramento de arroz é promover a estabilidade da produção mesmo sob déficit hídrico.

A diminuição da disponibilidade de água no solo leva ao estresse hídrico que, na planta, desencadeia uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas que estão sob o controle de diversos mecanismos genéticos. Esses mecanismos se expressam durante o estresse com a finalidade de proteger a maquinaria celular e garantir a sobrevivência da planta. As respostas ao estresse hídrico incluem o fechamento dos estômatos, repressão do crescimento celular e da fotossíntese e ativação da fotorrespiração (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Além disso, no caso de rápida desidratação, o estresse oxidativo (resultado do acúmulo de agentes oxidantes nas células) se desenvolve como um efeito secundário, podendo provocar danos à maquinaria fotossintética. Uma das principais consequências da diminuição da disponibilidade de água para a planta é a redução da fixação de carbono pelas folhas devido ao fechamento dos estômatos, o que provoca uma redução do seu crescimento (Chaves & Oliveira, 2004). A repressão do crescimento celular e, conseqüentemente, do crescimento da planta, é uma característica adaptativa para a sobrevivência sob estresse, pois permite que a energia que seria usada para essa finalidade seja desviada para as vias metabólicas responsáveis pelo combate aos danos provocados pelo déficit hídrico e pelas respostas ao estresse (Zhu, 2002). Xiong et al. (2006) avaliaram os efeitos do ácido abscísico (ABA – Abscisic Acid), um fitohormônio sinalizador que é produzido na planta em resposta ao estresse hídrico, em *Arabidopsis thaliana* e verificaram que ele é um dos responsáveis pela inibição do crescimento de raízes laterais sob estresse. Segundo esses autores, a inibição do crescimento das raízes laterais é vantajosa para a planta porque, dessa forma, ela pode aumentar sua reserva de energia economizando o que seria

usado para o desenvolvimento dessas raízes e/ou pode concentrar a sua energia para alongar a raiz principal em busca de reservas mais profundas de água no solo.

Com a finalidade de facilitar a adaptação ao déficit hídrico, a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse é induzida ou reprimida e o acúmulo de osmólitos e proteínas específicos é observado nas células vegetais (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). As substâncias acumuladas nas células são moléculas que possuem, em sua maioria, função protetora da maquinaria celular, como por exemplo, as proteínas “heat-shock” (proteínas de choque térmico), que previnem a desnaturação de outras proteínas, ou moléculas sinalizadoras, que ativam os mecanismos de defesa. Um sinalizador importante é o ABA, um fito-hormônio produzido nas raízes em processo de desidratação e que funciona como um sinalizador de longa distância, chegando até as folhas pelo xilema e provocando o fechamento dos estômatos (Chaves & Oliveira, 2004).

Os estômatos são pequenos poros presentes, em sua grande maioria, na parte inferior das folhas e são utilizados para a troca de gases com o meio externo (Raven et al., 2001). Cada poro é formado por um par de células esclerenquimáticas especializadas denominadas células guarda, que são responsáveis por regular o tamanho da abertura. O ar contendo dióxido de carbono (CO_2) entra na planta através dos estômatos. Uma vez nos cloroplastos, o CO_2 será usado na fotossíntese e o oxigênio resultante desse processo é eliminado através desses mesmos estômatos, juntamente com vapores de água em um processo denominado transpiração (Raven et al., 2001). O fechamento dos estômatos é uma das principais causas da redução da taxa fotossintética observada durante estresse hídrico moderado, isso porque provoca uma redução da disponibilidade de CO_2 nas células. No entanto, a redução da atividade da Rubisco (Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) e do nível de RuBP (Ribulose 1,5-bifosfato) só ocorrem quando o estresse é bastante severo (Chaves & Oliveira, 2004). A Rubisco é uma enzima que atua na fase de fixação do carbono da fotossíntese (Ciclo de Calvin), onde o CO_2 é convertido em compostos orgânicos de reserva, tais como açúcares e amido (Raven et al., 2001). A fotossíntese apresenta duas fases, uma composta por reações de transdução de energia, onde a energia luminosa é convertida em moléculas de ATP e NADPH, e outra composta por reações de fixação de carbono representadas pelo Ciclo de Calvin. No Ciclo de Calvin a Rubisco catalisa a ligação do carbono do CO_2 a um composto intermediário de cinco carbonos, a Ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) para a formação de duas moléculas de 3-fosfoglicerato que são as precursoras dos açúcares complexos formados ao final do ciclo (Raven et al., 2001). Especula-se que a redução dos níveis de CO_2 na célula provoque alterações na taxa fotossintética, mas que a capacidade de realizar

fotossíntese permaneça inalterada enquanto o estresse não for severo o suficiente para inativar a Rubisco (Bota et al., 2004).

A redução da disponibilidade de CO_2 traz consequências importantes para as taxas de produção e uso de energia nas células da planta, o que se traduz na redução da taxa fotossintética. A redução da concentração de CO_2 favorece a utilização do oxigênio (O_2) pela Rubisco na fase inicial do Ciclo de Calvin, num processo denominado fotorrespiração (Raven et al., 2001). Isso acontece porque a Rubisco, além do CO_2 , também aceita o O_2 como substrato, daí ela ter função de carboxilase e oxigenase. No entanto, a fotorrespiração é um processo ineficiente, pois ao invés da produção de duas moléculas de 3-fosfoglicerato são produzidas uma de 3-fosfoglicerato e uma de fosfoglicolato que, por sua vez, é levado para os peroxissomos e para a mitocôndria e, após algumas reações secundárias, é devolvido para os cloroplastos na forma de CO_2 (Raven et al., 2001). Portanto, esse processo é mais lento e gasta mais energia quando comparado à carboxilação da RuBP. A utilização do O_2 como substrato pela Rubisco é comum, especialmente em plantas do tipo C3, como é o caso do arroz, mas esse processo é aumentado pela diminuição da concentração de CO_2 intracelular (Chaves & Oliveira, 2004).

A fotorrespiração está relacionada ao desenvolvimento de uma outra forma de estresse que aparece associado ao estresse hídrico, o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é resultado do aumento dos níveis intracelulares de agentes oxidantes, também denominados espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species) (McKersie, 1996). Reações de redução utilizando componentes da cadeia de transporte de elétrons na fase das reações de transdução de energia da fotossíntese, seguida pela diminuição da disponibilidade de CO_2 intracelular resulta na redução do O_2 pela transferência dos elétrons para o oxigênio do fotossistema I (PSI) ou através das reações de Mehler (Chaves & Oliveira, 2004). A reação de Mehler consiste na redução do O_2 quando ele recebe elétrons no lugar do NADP^+ e ocorre sob condições onde o NADPH é fator limitante, ou seja, quando a taxa de oxidação do NADPH pelo Ciclo de Calvin é menor que o fornecimento de elétrons pelo PSI (McKersie, 1996). Isso provoca a produção de vários agentes oxidantes (ROS) tais como superóxidos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de radicais hidroxila que são altamente reativos e podem ser tóxicos ao metabolismo celular (Chaves & Oliveira, 2004).

Os ROS também podem representar risco para as membranas celulares sob estresse, pois podem provocar a peroxidação e a desesterificação dos lipídios, a desnaturação de proteínas e mutações no DNA. As membranas dos cloroplastos são particulamente susceptíveis ao estresse

oxidativo, porque os ROS são produzidos em grandes quantidades nessas membranas (Bowler et al., 1992). Além disso, o estresse hídrico pode provocar redução do conteúdo celular devido à perda de água, levando a um aumento da concentração de certos solutos que podem alcançar níveis tóxicos para a célula. A redução do volume celular e o aumento da viscosidade do citosol também podem aumentar a probabilidade da ocorrência da desnaturação de proteínas e da fusão de membranas (Hoekstra et al., 2001). Uma série de compostos orgânicos é capaz de exercer um papel de proteção da maquinaria celular, prevenindo a desnaturação das proteínas e ajudando a manter a integridade das membranas. Entre esses compostos destacam-se alguns aminoácidos como a prolina, o glutamato e a carnitina, e alguns açúcares como o manitol, o sorbitol, as fructanas, as trealoses e outros oligossacarídeos (Chaves & Oliveira, 2004). Os mecanismos de proteção nos quais essas substâncias estão envolvidas ainda não são bem entendidos, mas sabe-se que alguns açúcares, como o manitol e a trealose, atuam na estabilização e manutenção da estrutura de macromoléculas (proteínas e lipídios de membrana), evitando a formação de pontes de hidrogênio que poderiam provocar a alteração da estrutura tridimensional dessas moléculas. O acúmulo do aminoácido prolina também é conhecido como uma resposta comum das plantas ao estresse hídrico. A sua função de proteção está relacionada ao ajuste osmótico, pois ela atua como um osmo-regulador, neutralizando os radicais hidroxila livres, regulando a acidez do citosol, aumentando a capacidade de retenção de água e atuando como uma reserva de carbono e fonte de nitrogênio (Su & Wu, 2004).

Além da atuação individual de cada um dos compostos descritos acima, a sua importância na resposta da planta ao estresse hídrico pode ser associada à atuação dessas substâncias como solutos com função de ajuste osmótico nas células (Chaves & Oliveira, 2004). O ajuste osmótico é tido como uma característica importante para a tolerância à seca, pois reflete a capacidade da planta em evitar a perda excessiva de água, o que, direta ou indiretamente, afeta a produtividade sob estresse (Nguyen et al., 1997). Este ajuste ocorre pelo acúmulo de solutos nas células, o que permite a manutenção do turgor, contribuindo para uma diminuição da perda de água (Babu et al., 2003; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Zhang et al. (2001) fizeram uma busca por locos associados ao ajuste osmótico em uma população segregante de arroz e identificaram cinco regiões do genoma associadas a essa característica. Os autores afirmaram que o ajuste osmótico contribui para a tolerância à seca e que a delimitação de regiões associadas a essa característica pode ser feita por mapeamento fino, permitindo melhor compreensão de como o ajuste ocorre nas plantas.

As proteínas “heat-shock” também são sintetizadas sob estresse e têm um papel importante na proteção contra a degradação de outras proteínas, pois atuam como chaperonas, mantendo o estado de dobramento das proteínas (Chaves & Oliveira, 2004). Outro grupo de proteínas envolvido na tolerância ao estresse hídrico são as denominadas proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant – proteínas abundantes na embriogênese) (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Elas são assim denominadas porque são produzidas em grande quantidade durante o desenvolvimento embrionário nas sementes das plantas e constituem até 4% do conteúdo protéico dessas células e a sua principal função é a de prevenir a agregação de outras proteínas (Goyal et al., 2005). Os mecanismos genéticos de resposta, não só ao estresse hídrico, como também ao estresse salino e ao frio, vêm sendo elucidados em plantas e os genes envolvidos nessas respostas já foram, em sua maioria, identificados através de estudos genômicos e moleculares em espécies modelo.

Análises recentes de microarranjos permitiram a identificação de vários genes induzidos pelo estresse hídrico em *A. thaliana* e arroz (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Zhou et al., 2007). Microarranjos (“microarrays”) consistem em arranjos pré-definidos de fragmentos de DNA (mais comumente cDNAs ou ESTs) quimicamente ligados a uma superfície sólida carregada positivamente (chip de DNA). Os microarranjos permitem a detecção e quantificação de DNA (mRNA na forma de cDNA) quando este é colocado para hibridizar com o DNA fixado no chip. Essa análise é mais frequentemente utilizada para a determinação de padrões de expressão gênica e permite que a expressão diferencial de milhares de genes seja feita em único experimento. Zhou et al. (2007) utilizaram a análise de microarranjos para monitorar os níveis de expressão de um total de 36.926 genes em resposta à seca e à alta salinidade em três tecidos do arroz (caule, folha bandeira e panícula). Foram identificados 582, 1.257 e 614 genes que apresentaram aumento de expressão sob estresse hídrico, e 795, 646 e 1.305 genes que apresentaram diminuição na expressão sob estresse, na folha bandeira, no caule e na panícula, respectivamente. A anotação dos genes identificados revelou que eles codificavam vários tipos de fatores de transcrição, proteínas “heat-shock”, proteínas kinases e outras moléculas induzidas por estresse. Além disso, a maior parte dos genes que já haviam sido previamente identificados como responsivos ao estresse hídrico também foram identificados neste estudo, entre eles um gene que codifica um tipo de proteína LEA e um gene que codifica um fator de transcrição denominado DREB1, que participa de uma cascata regulatória ativada durante o estresse hídrico. Segundo Zhou et al. (2007), promotores de vários genes induzidos durante o estresse possuem dois elementos regulatórios *cis*, o elemento responsivo ao ABA (ABRE, ou ABA-responsive

element) e o elemento responsivo à desidratação (DRE, ou dehydration-responsive element). Os elementos ABRE e DRE funcionam na expressão gênica ABA-dependente e ABA-independente, respectivamente, durante a resposta ao estresse e foi demonstrado que a presença de múltiplas cópias desses elementos na região promotora ativa fortemente a expressão de genes induzidos pela seca (Zhou et al., 2007). Segundo Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki (2007) foi demonstrado que durante o estresse hídrico os fatores de transcrição DREB1 são rapidamente produzidos e se ligam aos elementos *cis* DRE, ativando a transcrição dos genes por eles regulados.

3.3 O ARROZ E O ESTRESSE HÍDRICO

O conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na resposta ao estresse hídrico é importante, pois permite a identificação dos genes expressos nessas condições e a manipulação dessas informações para a obtenção de cultivares mais tolerantes à seca. Quando se trata do desenvolvimento de cultivares tolerantes, é importante também ter em mente que as respostas genéticas que ocorrem nas células em resposta ao estresse hídrico se refletem em mudanças em alguns aspectos fisiológicos da planta e que esses aspectos também precisam ser entendidos. Além disso, quando se trata de cultivares, somente a sobrevivência da planta sob um período de seca não é o suficiente, pois as mesmas precisam manter níveis desejáveis de produtividade final da cultura representados pela estabilidade de produção (Fukai & Cooper, 1995). De acordo com Nguyen et al. (1997) os mecanismos fisiológicos de tolerância à seca estão relacionados ao uso moderado da água através da redução da área foliar e controle da perda de água pelas folhas, e habilidade das raízes em explorar camadas mais profundas do solo.

A planta pode utilizar recursos para evitar a perda de água e, conseqüentemente, evitar o estresse hídrico. O arroz não é muito eficiente em evitar perda de água pelas folhas porque possui pouca cera cuticular (Fukai & Cooper, 1995). A diminuição do potencial de água na planta provoca o enrolamento das folhas, ou seja, o enrolamento é induzido pela perda de turgor e por um ajuste osmótico deficiente (Hsiao et al., 1984). Portanto, plantas que apresentam enrolamento tardio ou que enrolam suas folhas o mínimo possível sob estresse apresentam maior capacidade de manutenção do turgor e maior controle sob a perda de água. Zhang et al. (2006) avaliaram o grau de enrolamento das folhas de linhagens de arroz sob estresse osmótico e selecionaram uma linhagem que apresentou nível bastante reduzido de enrolamento das folhas mesmo sob níveis altos de

estresse. Esses autores afirmam que a linhagem selecionada tem bom desempenho sob estresse hídrico, pois foi capaz de manter as folhas desenroladas sob o estresse osmótico.

Um sistema radicular eficiente é capaz de buscar água a grandes profundidades no solo. Sob condições de deficiência hídrica essa habilidade pode representar um maior potencial produtivo e maior estabilidade de produção, pois a planta será capaz de obter água das camadas mais profundas do solo, onde geralmente a retenção de umidade é maior (Nguyen et al., 1997). Segundo Manickavelu et al. (2006), uma melhor resposta ao déficit hídrico está relacionada a um sistema radicular mais profundo e mais espesso que, por sua vez, pode estar relacionado a uma maior resistência ao arranque. Raízes mais espessas resistem por mais tempo à falta de água no solo e produzem maior número de raízes secundárias, aumentando a densidade do sistema radicular e a sua capacidade de obtenção de água (Nguyen et al., 1997). De maneira geral o arroz possui sistema radicular superficial e é mais eficiente em profundidades até 60cm, onde possui sua capacidade máxima de busca de água no solo (Fukai & Cooper, 1995). Isso pode explicar a sua maior susceptibilidade à seca quando comparado com outras gramíneas, especialmente durante o período de floração (Fukai & Cooper, 1995; Lafitte et al., 2004). De uma maneira geral, o arroz de várzea possui sistema radicular com maior número de raízes adventícias e mais superficiais, enquanto que o arroz de terras altas possui raízes mais espessas e profundas (Nguyen et al., 1997). Zheng et al. (2003) avaliaram o desenvolvimento radicular de uma população sob as duas condições de cultivo (várzea e terras altas) e observaram que o número de raízes adventícias era menor no sistema radicular da população sob condição de terras altas, indicando que, como resposta ao ambiente com menor disponibilidade de água, havia uma tendência das plantas em produzir menor número de raízes, porém mais longas e mais espessas. Segundo Fukai & Cooper (1995), plantas com maior proporção de raízes profundas apresentam menor número de perfilhos. Ainda segundo esses autores, essa é uma característica marcante do arroz de terras altas, que possui raízes mais espessas e profundas e, portanto, desenvolve menor número de perfilhos. Segundo Babu et al. (2003), existe também uma forte correlação entre características de desenvolvimento de raiz e produção de grãos. Esses autores identificaram regiões do genoma que estavam associadas a características de raiz localizados na mesma região de locos identificados para produção de grãos sob estresse hídrico. Isso indica que plantas com sistema radicular melhor adaptado produzem mais grãos na seca e que a avaliação de plantas tolerantes pode, dependendo da situação, ser estimada somente pela produção. Isso é

vantajoso, pois características de raiz são difíceis de serem avaliadas e a tomada dos dados é bastante trabalhosa (Nguyen et al., 1997; Babu et al., 2003).

Segundo Fukai & Cooper (1995), produção total de grãos e proporção de grãos cheios são características muito influenciadas pelo estresse hídrico, pois estão diretamente relacionadas com a condução de fotoassimilados para as espiguetas no momento da emergência da panícula. A redução da disponibilidade de água durante a floração aumenta a proporção de espiguetas estéreis, diminuindo a produção, uma vez que essas características são altamente correlacionadas (Fukai & Cooper, 1995). Lafitte et al. (2004) analisaram uma população proveniente do cruzamento entre dois genótipos adaptados ao sistema de cultivo de terras altas e verificaram que a característica mais afetada pelo déficit hídrico foi a proporção de espiguetas estéreis. Lanceras et al. (2004) avaliaram uma população proveniente do cruzamento entre duas linhagens tolerantes à seca para diversos componentes de produção sob estresse hídrico e detectaram uma alta correlação negativa entre produção de grãos e dias até a floração e entre produção e proporção de espiguetas estéreis, indicando que as linhagens que demoraram a florescer sofreram mais com o estresse. Segundo Xu et al. (2005), o período de florescimento pode ser usado como um mecanismo de escape à seca, de maneira que as plantas podem acelerar o florescimento e encher os grãos antes que o estresse se torne muito severo. Por outro lado, a correlação entre floração e produção pode estar relacionada a uma maior capacidade da planta em direcionar os fotoassimilados para o enchimento precoce dos grãos, característica que, por sua vez, está relacionada a uma floração mais precoce. Em milho, o intervalo de floração (intervalo, contado em dias, entre a o surgimento da inflorescência masculina e da feminina) é tido como uma característica determinante para a tolerância à seca, pois já foi demonstrado que plantas que apresentam menores intervalos de floração apresentam maior número de espigas por planta e maior índice de colheita nessas condições (Bolaños et al., 1990). Essa alta correlação é explicada, principalmente, pela maior capacidade das plantas em conduzir assimilados para a espiga em formação, o que, conseqüentemente, levaria a um menor intervalo de floração. Bolaños & Edmaedes (1996) avaliaram seis populações elite de milho sob duas condições de estresse hídrico, um moderado e um severo, e verificaram altas correlações genéticas e fenotípicas entre intervalo de floração e produção de grãos na seca. Esses autores sugerem que um menor intervalo de floração está diretamente relacionado a uma distribuição eficiente dos assimilados para a espiga durante a floração.

O conhecimento de todos os fatores envolvidos na tolerância à seca e das respostas das plantas ao estresse fornece as informações que servem de base para a obtenção de cultivares tolerantes. A identificação dos genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico em espécies modelo como *A. thaliana* e o arroz permite que eles sejam isolados e introduzidos em outras espécies através de técnicas de transformação (Edmeades et al., 2004). Essas técnicas oferecem a oportunidade de testar a eficiência de genes candidatos de tolerância à seca e da obtenção de genótipos transgênicos mais tolerantes e capazes de apresentar maior estabilidade de produção (Edmeades et al., 2004). Segundo Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki (2007), a introdução de genes já identificados e que codificam enzimas que atuam no processo de biossíntese de solutos como a prolina e vários açúcares (manitol, trealose, galactinol e rafinose) aumentaram a tolerância à seca em plantas transgênicas. Genes que codificam proteínas LEA e proteínas “heat-shock” também foram experimentalmente introduzidos em *A. thaliana* e aumentaram a tolerância à seca dos genótipos transgênicos. Quando o foco da obtenção de cultivares tolerantes forem características complexas, como dias até a floração e produção de grãos, deve-se considerar que vários genes, além daqueles relacionados à sobrevivência ao estresse, estão envolvidos. A genética molecular e, mais recentemente, a genômica oferecem a oportunidade de detecção de regiões do genoma associadas a características quantitativas (QTLs – Quantitative Trait Loci), abrindo caminho para um melhor entendimento do controle genético dessas características e para a possibilidade da utilização da seleção assistida por marcadores (MAS – Marker Assisted Selection) (Tuberosa & Salvi, 2006).

No entanto, quando comparado com outras gramíneas, o arroz é menos tolerante à seca, o que pode limitar o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes (Fukai & Cooper, 1995; Liu et al., 2004). Isso pode significar que a diversidade de alelos para as características relacionadas à tolerância dentro do conjunto gênico do arroz cultivado é limitada. Tanksley & McCouch (1997) chamaram a atenção para a diminuição da variabilidade alélica nas cultivares de arroz e como esse fenômeno pode torná-las mais vulneráveis a pragas, doenças e outros estresses ambientais. Espécies silvestres são um importante reservatório de alelos e têm sido utilizadas como fonte de diversidade para várias características em arroz (Brar & Kush, 1997; McCouch et al., 2007). Segundo Liu et al. (2004), apesar de a maioria das espécies silvestres do gênero *Oryza* serem adaptadas a ambientes semi-aquáticos, elas devem ser exploradas como fonte de alelos de tolerância à seca que não estão presentes no arroz cultivado. Esses autores avaliaram seis espécies silvestres de arroz para diversas características

relacionadas à resposta ao estresse hídrico e verificaram que elas apresentaram bons níveis de ajuste osmótico e que vários acessos sobreviveram a um longo período de seca.

3.4 O GÊNERO ORYZA

O arroz cultivado (*Oryza sativa*) pertence à família Poaceae (Graminae) e subfamília *Oryzoideae* (Vaughan et al., 2005). O gênero *Oryza* compreende 23 espécies diplóides e tetraplóides que representam 10 grupos citogenéticos: A-, B-, C-, BC, CD, E-, F-, G-, HJ e HK (Zhu & Ge, 2005). Segundo classificação mais recente, de Vaughan et al. (2005), essas espécies podem ser agrupadas em quatro complexos: *O. sativa* (AA), *O. officinalis* (BB, CC, BBCC, CCDD, EE), *O. ridleyi* (HHJJ) e *O. granulata* (GG), sendo que as espécies *O. schlechteri* e *O. brachyantha* não devem ser agrupadas em nenhum destes complexos, pois apresentam características que poderiam classificá-las como pertencentes a outro gênero (*Leersia*) e, portanto, apresentariam-se no limite da classificação do gênero *Oryza*. A *O. brachyantha* possui genoma FF (Vaughan et al., 2003) enquanto que o grupo citogenético HK foi atribuído, por Ge et al. (1999a), à espécie *Oryza schlechteri* que, até então, não possuía grupo citogenético conhecido. Zhang et al. (2007) avaliaram uma região de 247kb do genoma da *O. brachyantha* e a compararam à região ortóloga da *O. sativa* e concluíram que a divergência entre as duas espécies deve ter acontecido a 10 milhões de anos.

As espécies do complexo *O. ridleyi* ocorrem desde o sudeste da Ásia até Papua Nova Guiné (Oceania), enquanto que o complexo *O. granulata* ocorre em toda a Ásia. Estes dois complexos compreendem as espécies mais próximas dos ancestrais do gênero *Oryza* e a sua distribuição pela região Austral-Asiática indica que esta foi o centro de origem do gênero (Vaughan et al., 2005). O complexo *O. ridleyi* compreende as espécies tetraplóides *O. ridleyi* (HHJJ) e *O. longiglumis* (HHJJ), enquanto que o complexo *O. granulata* engloba as espécies diplóides *O. granulata* (GG) e *O. meyeriana* (GG) (Vaughan et al., 2003). As espécies dos complexos *O. sativa* e *O. officinalis* são mais recentes e os seus centros de origem são atribuídos a regiões que se estendem desde o oeste da África até o sul da Ásia. O complexo *O. officinalis* compreende espécies diplóides e tetraplóides, sendo elas *O. officinalis* (CC), *O. minuta* (BBCC), *O. rizophomatis* (CC), *O. eichingeri* (CC), *O. punctata* (BBCC), *O. latifolia* (CCDD), *O. alta* (CCDD), *O. grandiglumis* (CCDD) e *O. australiensis* (EE) (Vaughan et al., 2003). Todas as espécies agrupadas no complexo *O. sativa* são diplóides e possuem genoma AA.

São elas *O. sativa*, *O. rufipogon*, *O. nivara*, *O. glaberrima*, *O. barthii*, *O. logistaminata*, *O. meridionalis* e *O. glumaepatula*.

Entre as 23 espécies do gênero *Oryza*, nove são tetraplóides e despertam interesse porque podem ajudar a entender os processos de evolução e especiação do gênero. Segundo Ge et al. (1999a), a poliploidia é tida como um mecanismo de especiação em plantas. O genoma de uma planta tetraplóide, por exemplo, pode ser uma combinação de dois genomas diplóides e ter sido originado por eventos de hibridização entre espécies divergentes. O genoma CC está presente em seis espécies tetraplóides e acredita-se que eventos de poliploidização tenham ocorrido pelo menos quatro vezes, originando os genomas BBCC e CCDD (Vaughan et al., 2003). As espécies de genoma CCDD *O. latifolia*, *O. grandiglumis* e *O. alta* são encontradas nas Américas Central e do Sul e despertam interesse porque nenhuma espécie diplóide com genoma DD é conhecida. Algumas teorias sugerem que este genoma pode ter sido originado de uma modificação nos genomas CC ou EE, ou que ele pode ter estado presente em uma espécie extinta ou que ainda não foi descoberta (Vaughan et al., 2003).

Maior atenção é dada às espécies de genoma AA devido ao fato de que as duas espécies cultivadas do gênero *Oryza* pertencem a esse grupo: *O. sativa*, que é cultivada e consumida no mundo todo, e *O. glaberrima*, cujo cultivo está restrito a algumas regiões do oeste da África (Londo et al., 2006). A *O. sativa* tem um papel importante na agricultura mundial porque mais de 90% do arroz cultivado pertence a essa espécie (Kush & Brar, 2002). Tipicamente a *O. sativa* é dividida em duas subespécies, *indica* e *japonica*. Essa divisão se dá com base nas diferenças em algumas características, tais como forma do grão, reação ao fenol, sensibilidade ao cloreto de potássio e cor das folhas (Garris et al., 2005). De uma maneira geral a subespécie *indica* é encontrada nas regiões inundadas da Ásia tropical enquanto que a subespécie *japonica* é encontrada nas regiões de terras altas e elevações do Sul da Ásia (Garris et al., 2005). A *japonica* pode também ser diferenciada em dois subgrupos, *japonica tropical* e *japonica temperada* (Londo et al., 2006).

O centro de origem da espécie *O. sativa* é a Ásia e acredita-se a sua domesticação tenha ocorrido aproximadamente entre 10.000 e 9.000 anos (Londo et al., 2006; Kawakami et al., 2007). Até recentemente havia uma divergência sobre qual seria o seu ancestral, *O. rufipogon* ou *O. nivara*. Isso porque *O. rufipogon* é uma espécie perene, enquanto que *O. nivara* tem hábito de crescimento anual (Londo et al., 2006). Atualmente, com base em estudos que investigaram a domesticação e as relações filogenéticas das espécies de genoma AA, é seguro afirmar que *O. rufipogon* é o ancestral da *O. sativa* (Garris et al., 2005; Londo et al., 2006; Duan et al., 2007). No entanto, é difícil delinear o

papel da *O. nivara* na domesticação da *O. sativa*, pois a primeira é considerada por alguns autores como um ecotipo de *O. rufipogon* (Vaughan et al., 2003; Zhu & Ge, 2005; Kawakami et al., 2007), enquanto outros afirmam que *O. nivara* e *O. rufipogon* devam ser consideradas duas espécies distintas (Duan et al., 2007). Portanto, a participação da *O. nivara* na domesticação da *O. sativa* ainda é discutida (Sweeney & McCouch, 2007). Existem, ainda, duas teorias diferentes sobre a origem das subespécies *indica* e *japonica* (Zhu & Ge, 2005; Londo et al., 2006). A primeira sugere que a subespécie *indica* tenha sido domesticada a partir da *O. rufipogon* e que a subespécie *japonica* foi selecionada a partir da *indica* enquanto se buscavam novos tipos adaptados a diferentes condições climáticas. A segunda teoria sugere que as duas subespécies tenham sido originadas de dois eventos de domesticação distintos. Com base em estudos recentes, a hipótese mais aceita é a de que as subespécies *indica* e *japonica* foram originadas de dois eventos de domesticação distintos, ou seja, de duas populações diferentes da *O. rufipogon* (Garris et al., 2005; Nakayama, 2005; Hu et al., 2006; Londo et al., 2006; Kawakami et al., 2007). Ma & Bennetzen (2004) compararam as sequências do genoma do arroz obtidas das cultivares Nipponbare (*japonica*) e 9311 (*indica*) e estimaram que o tempo de divergência entre as duas subespécies seja de aproximadamente 0,44 milhões de anos.

A outra espécie cultivada de arroz, *O. glaberrima*, foi originada nas bacias do delta do Rio Nilo no Oeste da África e o seu ancestral é a espécie *O. barthii* (Sarla & Swamy, 2005). Estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares demonstraram que o arroz Africano é único, podendo ser facilmente diferenciado do arroz de origem Asiática, e que *O. barthii* e *O. glaberrima* apresentam relação genética muito próxima (Sweeney & McCouch, 2007). O cultivo da *O. glaberrima* no Oeste da África é datado de 3.500 anos e se dá, tradicionalmente, em várzeas e terras altas e terras baixas por irrigação dependente de chuva. Atualmente o cultivo de arroz na África incorporou tecnologias e cultivares *O. sativa* vindas da Ásia. Contudo, a *O. glaberrima* é mais bem adaptada aos estresses bióticos e abióticos da região (Heuer et al., 2003). Os sistemas modernos de cultivo de arroz não são adequados para a *O. glaberrima* principalmente porque ela apresenta baixa produtividade e estrutura de panícula inadequada, com grãos que se desprendem com grande facilidade (Heuer et al., 2003). No entanto, essa espécie possui características importantes, tais como elevado vigor de planta, que lhe permite competir com ervas daninhas, tolerância à seca, resistência a insetos e doenças e a habilidade de se desenvolver em ambientes variados (Sarla & Swamy, 2005). Com o objetivo de combinar essas características de *O. glaberrima* com as características de produção e arquitetura de planta de *O. sativa*, novas variedades de arroz denominadas NERICAs (New Rice for Africa – Novo

Arroz para a África) foram desenvolvidas. Essas variedades são linhagens derivadas de híbridos interespecíficos e apresentam grande habilidade de competição com ervas daninhas, maior número de perfilhos que ambos os parentais e produção de grãos semelhante à *O. sativa* (Sarla & Swamy, 2005).

O sucesso do desenvolvimento das NERICAs na África demonstra o potencial de utilização da *O. glaberrima* e das espécies silvestres como fonte de alelos úteis para o arroz cultivado. Plantas silvestres apresentam características desfavoráveis sob o ponto de vista dos sistemas de cultivo modernos de arroz, ou seja, de forma geral, apresentam estrutura de panícula aberta com poucos ramos secundários, o que confere baixa produção de grãos, sendo que estes se desprendem facilmente e são de baixa qualidade (Sweeney & McCouch, 2007). Embora a maioria dos alelos silvestres possam ser inferiores para características relacionadas ao cultivo, tais como tipo e produção de grãos e arquitetura de planta, as suas combinações e a obtenção de segregantes transgressivos a partir de cruzamentos interespecíficos têm demonstrado que a transferência de alelos favoráveis de espécies silvestres para o arroz cultivado é uma estratégia interessante para o aumento da variabilidade e introdução de genes de interesse em cultivares comerciais (McCouch et al., 2007).

As espécies silvestres que possuem genoma AA são tidas como importante reservatório de alelos que podem ser transferidos para o arroz cultivado (*O. sativa*) especialmente porque, por compartilharem o mesmo tipo de genoma, podem ser mais facilmente cruzadas, reduzindo problemas de esterilidade e incompatibilidade gamética que ocorrem com grande frequência em cruzamentos entre espécies que possuem genomas diferentes (ex. AA x CC; AA x BBCC) (Brar & Kush, 1997). Entre as espécies de genoma AA, *O. barthii*, *O. longistaminata* e *O. meridionalis* são reservatórios de alelos ainda pouco explorados. A *O. barthii* (anteriormente denominada *O. breviligulata*) é originária da África, e o fato de ser ancestral da *O. glaberrima* desperta grande interesse científico (Sweeney & McCouch, 2007). A *O. longistaminata*, também nativa da África, é uma espécie perene, alógama e parcialmente auto-incompatível, enquanto que a *O. meridionalis* é nativa da Austrália, apresenta hábito de crescimento anual e é autógama (Zhu & Ge, 2005).

A espécie *O. rufipogon*, em contrapartida, tem sido extensivamente estudada, porque é o ancestral da *O. sativa* e pode ser facilmente cruzada com linhagens e cultivares de arroz para a introgressão de alelos de interesse. Essa espécie apresenta hábito de crescimento anual e habita diversos ambientes da Ásia (McCouch et al., 2007). A partir do início da década de 1990 teve início um esforço para a utilização da *O. rufipogon* em cruzamentos interespecíficos com cultivares e linhagens

da espécie *O. sativa* com o objetivo de introgridir alelos silvestres para o background genético do arroz cultivado (McCouch et al., 2007). Xiao et al. (1998) foram pioneiros na utilização da *O. rufipogon* como doadora de alelos para uma cultivar *O. sativa* e verificaram que as introgressões silvestres tinham potencial para melhorar o desempenho em características agrônômicas de interesse, incluindo produção de grãos. Essa conclusão foi tomada com base na observação da presença de segregantes transgressivos na população avaliada, ou seja, indivíduos cujo desempenho excedia ao de ambos os parentais. Segregantes transgressivos foram observados em cruzamentos interespecíficos com a *O. rufipogon* (Moncada et al., 2001; Thomson et al., 2003; Septiningsih et al., 2003; Tian et al., 2006; Tan et al. 2007). Nesses trabalhos foram identificadas regiões introgrididas do parental silvestre associadas com variação transgressiva para características relacionadas à produção. O potencial da *O. rufipogon* como doadora de alelos de tolerância a estresses abióticos também foi explorada. Nguyen et al. (2003) identificaram regiões do genoma associadas ao comprimento de raiz em uma população segregante avaliada para tolerância ao alumínio tóxico no solo. Esses autores observaram que o parental silvestre *O. rufipogon* apresentou maior comprimento de raiz sob estresse e que o efeito positivo da tolerância ao alumínio era dado pelos alelos silvestres. Zhang et al. (2006) identificaram uma linhagem contendo duas regiões introgrididas da *O. rufipogon* associadas a características de tolerância à seca.

A *O. glumaepatula* é a espécie de genoma AA que ocorre nas Américas Central e do Sul, sendo encontrada desde 23°N em Cuba até 23°S no Brasil (Vaughan et al., 2003; Sweeney & McCouch, 2007). A sua importância reside no fato de que é encontrada no Brasil e distribui-se por várias regiões, sendo adaptada às condições de clima e solo tropicais e, portanto, é uma fonte promissora de alelos de interesse (Brondani et al., 2005). Essa espécie pode ser encontrada em biomas tão diversos quanto a Amazônia, o Pantanal Matogrossense e bacias hidrográficas dos Estados de Goiás, Tocantins e Roraima (Karasawa et al., 2007). Até a década passada a *O. glumaepatula* era considerada um ecotipo da *O. rufipogon* e era agrupada, juntamente com as espécies *O. longistaminata* da África, *O. meridionalis* da Austrália e a própria *O. rufipogon*, em um complexo denominado *O. perennis* (Akimoto et al., 1998). Isso porque estudos de caracterização baseados em caracteres morfológicos não encontraram diferenças que pudessem justificar a separação das duas espécies (Akimoto et al., 1998). Estudos posteriores, no entanto, confirmaram que a *O. glumaepatula* é uma espécie distinta das demais. Juliano et al. (1998) analisaram diversas características morfológicas em acessos de *O. glumaepatula*, *O. rufipogon* e *O. nivara* e, através de análise

multivariada, encontraram diferenças suficientes para o reconhecimento da *O. glumaepatula* como uma espécie distinta. Naredo et al. (1998) realizaram estudos de hibridização entre acessos de *O. glumaepatula*, *O. rufipogon*, *O. nivara* e *O. meridionalis* e observaram que os híbridos formados entre a *O. glumaepatula* e as outras espécies eram altamente estéreis, com fertilidade nunca superior a 5%, demonstrando o isolamento reprodutivo da espécie e confirmando o resultado do estudo anterior. Ge et al (1999b), utilizando marcadores moleculares baseados em sequências aleatórias do DNA nuclear (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA) verificaram uma separação clara entre acessos de *O. glumaepatula* coletados na Bacia do Rio Amazonas e de *O. rufipogon* coletados na China. Estes autores afirmaram que as análises de agrupamento revelaram uma separação clara entre as duas populações e que, portanto, a *O. glumaepatula* deveria ser considerada uma espécie distinta da *O. rufipogon*. Zhu & Ge (2005) também confirmaram a distinção da *O. glumaepatula* das demais espécies de genoma AA utilizando sequências de introns de genes nucleares. Duan et al. (2007) também confirmaram a separação da *O. glumaepatula* das demais utilizando marcadores baseados em sequências de DNA de cloroplastos, mitocondrial e nuclear.

Existem divergências quanto ao hábito de crescimento da *O. glumaepatula*, sendo que alguns autores sugerem que ela seja anual, bi-anual ou perene, dependendo do tipo de ambiente que ela ocupe (Karasawa et al., 2007). No entanto, o ciclo de vida da espécie sugere que ela seja anual (Vaughan et al., 2003). Em seu habitat natural, a *O. glumaepatula* ocupa leitos e margens de rios ou várzeas (depressões alagáveis nas proximidades dos rios) e se reproduz por sementes (Juliano et al., 1998; Vaughan et al., 2003; Karasawa et al., 2007). A germinação das sementes se dá na estação seca, quando a água escoar deixando as margens dos rios livres. As plantas crescem rapidamente em resposta à água do rio que sobe com o início do período de chuva. Os colmos das plantas adultas se quebram e elas então flutuam na superfície da água. Nessa condição elas normalmente se associam às outras plantas através do embaraçamento das raízes adventícias e perfilhos e são arrastadas pelo vento e pela força da água rio abaixo (Akimoto et al., 1998). Apesar de as plantas se desprenderem pela quebra do colmo, a *O. glumaepatula* não apresenta reprodução vegetativa. A sua reprodução ocorre preferencialmente por sementes que se desprendem à medida em que a plantas flutuam rio abaixo (Akimoto et al., 1998; Juliano et al., 1998, Vaughan et al., 2003). Segundo Rubim (1994), a alongação do colmo ocorre rapidamente em resposta ao enchimento dos rios e a emissão das panículas se inicia aproximadamente de três a quatro meses após a germinação. As plantas se desenvolvem submersas e podem alcançar de três a quatro metros de altura. Estudos de diversidade

e variabilidade genética realizados em populações de *O. glumaepatula* coletadas na Amazônia (Akimoto et al., 1998; Buso et al., 1998; Brondani et al., 2005), no Pantanal Matogrossense (Buso et al., 1998; Brondani et al., 2005) e no Cerrado Goiano (Brondani et al., 2005) detectaram fluxo gênico entre populações dentro de cada ambiente e sugeriram que esse fluxo ocorria devido à dispersão de sementes e não por pólen e/ou fecundação cruzada, pois esses estudos também concluíram que a *O. glumaepatula* é uma espécie autógama. Brondani et al. (2005) estimaram a taxa de fecundação cruzada aparente em três populações de *O. glumaepatula* e observaram valores que variaram de 3.63% a 18.4%, não muito diferentes das taxas estimadas por Kurasawa et al. (2007), que variaram de 1.1% a 22.3%. Os autores concluíram que a espécie é completamente autógama ou apresenta sistema de reprodução misto com predominância de autogamia.

A *O. glumaepatula* tem sido explorada como fonte de alelos de interesse visando principalmente à obtenção de linhagens para serem usadas nos programas de melhoramento de arroz do Brasil. Brondani et al. (2001, 2002) realizaram o primeiro cruzamento interespecífico utilizando a *O. glumaepatula* e avaliaram a população proveniente deste cruzamento para várias características relacionadas à produção. Estes autores verificaram que os alelos provenientes da espécie silvestre foram responsáveis pelo aumento do número de perfilhos e panículas, características que estão diretamente relacionadas à arquitetura de planta e que podem afetar positivamente a produção de grãos. As plantas provenientes deste cruzamento interespecífico originaram linhagens de introgressão que foram avaliadas, em três locais, para diversas características relevantes aos programas de melhoramento de arroz (Rangel et al., 2005). Os autores verificaram que essas linhagens apresentavam elevado vigor de planta, característica que favoreceu a produção na rebrota (soca), aumentando a produção total de grãos. Este trabalho concluiu que os alelos de *O. glumaepatula* eram responsáveis pelo aumento de número de perfilhos e panículas e pelo aumento do vigor das linhagens avaliadas. Existe grande interesse em conservar e utilizar os acessos de *O. glumaepatula* coletados em diversas regiões do Brasil, pois eles são considerados fontes potenciais de alelos de genes relacionados à resistência e/ou tolerância a estresses bióticos e abióticos, tais como doenças, altos níveis de alumínio no solo, seca, dentre outros (Brondani et al., 2005).

3.5 O GENOMA DO ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*) é considerado espécie modelo para os cereais, porque apresenta genoma pequeno quando comparado com outras gramíneas, uma vasta coleção de germoplasma, contendo linhagens e variedades cultivadas e outros recursos genéticos (representados pelas espécies silvestres e variedades tradicionais) e, principalmente, grande quantidade de informação genética e molecular disponível (Paterson et al., 2005; Xu et al., 2005). A disponibilidade das sequências do genoma estrutural das duas subespécies do arroz, *indica* e *japonica*, aumentou ainda mais a sua importância como espécie modelo. Os primeiros resultados de projetos de sequenciamento do genoma do arroz foram publicados em 2002 com as sequências da cultivar “93-11” (subespécie *indica*) e da cultivar “Nipponbare” (subespécie *japonica*). O sequenciamento do genoma da cultivar 93-11 foi realizado por um consórcio Chinês (BGI – Beijing Genomics Institute) (Yu et al., 2002) e a cultivar Nipponbare teve a primeira versão do seu genoma sequenciado por uma empresa privada, a Syngenta, através do seu instituto de pesquisas (TMRI – Torrey Mesa Research Institute) (Goff et al., 2002). Em ambos os casos foi utilizada a estratégia de sequenciamento por “shotgun”, onde o DNA genômico é inteiramente fragmentado por sonicação ou por enzimas de restrição e os fragmentos, após sequenciados, podem ser sobrepostos para a obtenção da sequência completa (Paterson et al., 2005). Essa estratégia permitiu que aproximadamente 69% do genoma da *indica* e 78% do genoma da *japonica* fossem representados (IRGSP, 2005).

Uma segunda versão do sequenciamento do genoma da cultivar Nipponbare foi realizada pela Monsanto através da Universidade de Washington utilizando uma estratégia que envolveu o sequenciamento de clones em cromossomos artificiais de bactérias (BACs – Bacterial Artificial Chromosomes) com baixa redundância. Uma cobertura de aproximadamente 250 Mpb (aproximadamente 73%) do genoma foi obtida e permitiu a identificação de genes nas sequências dos BACs (Bennetzen, 2002). A terceira e mais completa versão do genoma da Nipponbare foi obtida por um consórcio internacional envolvendo 10 países: Japão, Estados Unidos, China, Taiwan, Coreia, Índia, Tailândia, França, Brasil e Reino Unido, que foi denominado IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP>). Foi utilizada uma estratégia de sequenciamento por clone a clone, onde clones contendo longos insertos de DNA que se sobrepõem foram sequenciados, de maneira que cada clone sequenciado pôde ser associado a uma posição específica do mapa genético do arroz (Paterson et al., 2005). Segundo IRGSP (2005), foram utilizados clones de PACs (P1-derived Artificial Chromosomes, ou cromossomos artificiais do bacteriófago P1) , BACs e fosmídeos, os quais foram sequenciados com redundância de até dez vezes. Dessa forma, as

sequências da cultivar Nipponbare foram linearmente organizadas em um mapa com cobertura de 95% do genoma (IRGSP, 2005). A estratégia de sequenciamento clone a clone é cara e lenta quando comparada com a estratégia “shotgun”, mas oferece sequências mais precisas e que fornecem cobertura completa do genoma (Bennetzen, 2002).

O sequenciamento do genoma do arroz trouxe uma grande evolução para os estudos genéticos e moleculares da espécie, tornando públicas informações que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de marcadores moleculares capazes de amostrar virtualmente qualquer região do genoma, predição da função de sequências regulatórias e/ou genes e dos polipeptídeos por eles codificados, localização de marcas moleculares nos mapas genéticos e físicos, entre outras (Tyagi et al., 2004). A disponibilidade das sequências do arroz também permitiu que inferências mais precisas sobre particularidades do seu genoma fossem feitas, facilitando a utilização das informações como ferramentas moleculares. O tamanho do genoma do arroz era estimado em aproximadamente 430 Mpb (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002), mas a obtenção de sequências mais completas e precisas acompanhada do alinhamento dos clones permitiu que o tamanho do genoma do arroz fosse estimado em 389 Mpb (IRGSP, 2005). O IRGSP (2005) estimou um número total de 37.544 sequências codantes, resultando em uma densidade de um gene a cada 9.9 kpb. A densidade de genes expressos foi maior nas porções distais dos cromossomos quando comparadas às regiões dos centrômeros. Isso só não foi verificado nos braços curtos dos cromossomos 4, 9 e 10, pois são altamente heterocromáticos (IRGSP, 2005). A proporção de inserções de DNA mitocondrial e de cloroplastos no genoma nuclear foi estimada em 0.19% e 0.24%, respectivamente, e a proporção de elementos transponíveis (transposons) no genoma do arroz foi estimada em 35%. A densidade dos transposons foi maior nos cromossomos 8 e 12 (38% e 38.3%, respectivamente) e menor nos cromossomos 1, 2 e 3 (31%, 29.8% e 29%) (IRGSP, 2005). Um total de 18.828 microssatélites com repetições de di, tri e tetra-nucleotídeos, representando 47 famílias de repetições (motivos) foram identificados, com uma média de 51 microssatélites a cada Mpb, e com maior densidade ocorrendo no cromossomo 3 (55 por Mpb) e menor densidade no cromossomo 4 (41 por Mpb) (IRGSP, 2005). Segundo Xu et al. (2005), estima-se que o genoma do arroz contenha 1.703.176 polimorfismos de uma única base (SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms) e 479.406 inserções/deleções (indels), o que perfaz uma média de aproximadamente um SNP a cada 268pb e um indel a cada 953pb. Todas as estimativas apresentadas acima foram feitas com base na sequência completa do genoma da cultivar Nipponbare obtidas pelo IRGSP. Recentemente uma anotação mais precisa dessas sequências foi feita através do Projeto de

Anotação do Arroz (The Rice Annotation Project) com a finalidade de facilitar a utilização das informações provenientes do sequenciamento do genoma do arroz e de fornecer dados que possam ser usados em análises comparativas entre o arroz e outras espécies de plantas (The Rice Annotation Project, 2007). Utilizando uma metodologia de anotação mais conservadora, onde a identificação dos genes era feita somente quando haviam transcritos já identificados, o número de genes estimados foi de aproximadamente 32.000, número menor que os quase 38.000 identificados anteriormente.

A disponibilidade de todas as informações provenientes da análise das sequências do arroz apresenta grandes possibilidades para a busca por funções de genes e suas interações, ajudando a entender e desvendar rotas metabólicas e como elas atuam na expressão de características alvo dos programas de melhoramento. Somando-se a isso as informações já amplamente disponíveis de mapas genéticos e físicos do arroz, têm-se ferramentas que podem ser usadas para a identificação de genes e regiões ortólogas em outros cereais, ajudando a entender a história evolutiva e a sintonia entre essas espécies, além da busca por genes e vias metabólicas conservadas entre as gramíneas (Xu et al., 2005). De fato a grande similaridade existente entre o arroz e outras gramíneas pode facilitar a busca e isolamento de genes de importância agrônômica nos cereais (Ronald & Leung, 2002). A genômica comparativa permite que proteínas cujas funções já tenham sido preditas (em organismos mais simples como os fungos, por exemplo) sejam localizadas e que a função e a importância dessas proteínas no arroz e/ou outras gramíneas sejam testadas. A partir dos genes candidatos, responsáveis pela expressão dessas proteínas, a sua função pode ser testada através de super-expressão, onde um forte promotor é adicionado à sequência do gene, ou por “knock-out”, onde o gene é inativado para permitir a observação das consequências da ausência da sua função (Ronald & Leung, 2002). A disponibilidade da sequência do genoma do arroz traz a perspectiva da identificação da função de todos os genes, facilitando a busca por funções das proteínas sob diferentes situações e das suas interações nas diversas rotas metabólicas que resultam na expressão de características complexas (Ronald & Leung, 2002).

Bases de dados contendo as informações úteis provenientes dos projetos de sequenciamento do arroz são públicas e podem ser acessadas por qualquer pessoa ou grupo de pesquisa interessados, sendo que se destacam o Gramene, uma base de dados para comparação do genoma de gramíneas e que apresenta um amplo espectro de informações relacionadas às gramíneas de importância comercial, tais como arroz, milho, trigo, cevada, aveia, sorgo, milheto, centeio, entre outros (www.gramene.org), a base de dados do IRGSP (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP>) e o NCBI (National

Center for Biotechnology Information), uma base de dados internacional que contém todo tipo de informações científicas relacionadas a biologia molecular para todas as espécies, desde microorganismos simples até humanos (www.ncbi.nlm.nih.gov). Todas as ferramentas moleculares disponíveis antes e depois do sequenciamento do genoma do arroz têm sido muito úteis aos programas de melhoramento nos últimos anos. A sua contribuição para as mais diversas finalidades, desde o desenvolvimento de marcadores moleculares, passando pela busca de genes e sequências regulatórias e suas funções, até a obtenção de cultivares transgênicas, tem promovido um aumento considerável do conhecimento sobre a expressão e interação de características agrônômicas de interesse (Gowda et al., 2003).

3.6 MARCADORES MOLECULARES EM ARROZ

Marcadores moleculares são definidos como um conjunto de técnicas que permitem a identificação da variação entre indivíduos diretamente no DNA. Eles permitem que fragmentos do genoma sejam identificados, através de técnicas de clivagem ou de amplificação do DNA, e que as diferenças destes fragmentos entre os indivíduos sejam detectadas. Essas diferenças são denominadas polimorfismos e podem ser usadas para a caracterização e avaliação de estruturas populacionais, identificação de cultivares, construção de mapas genéticos, detecção de regiões do genoma associadas a características de interesse, entre muitos outros estudos úteis ao melhoramento de plantas. Devido ao fato de detectarem polimorfismo diretamente no DNA, os marcadores moleculares apresentam a vantagem de serem neutros, ou seja, não são influenciados pelo ambiente ou pelo estágio de desenvolvimento do organismo (Collard et al., 2005).

O desenvolvimento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis & Faloona, 1987) possibilitou o surgimento de classes de marcadores que contornaram as limitações apresentadas pelos marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Esta técnica baseia-se na amplificação de regiões do DNA utilizando oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) em uma solução tampão contendo a enzima DNA polimerase e desoxinucleotídeos. A amplificação dos fragmentos se dá pela separação da fita dupla de DNA, anelamento do “primer” à sua região homóloga e extensão da cadeia pela DNA polimerase (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores moleculares baseados na técnica de PCR diferem entre si pela especificidade de anelamento ao DNA e pelo tipo de seqüência amplificada, ou seja, eles podem amplificar seqüências aleatórias, como os marcadores

RAPD, ou seqüências específicas do genoma, como os marcadores microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats). Estes marcadores são vantajosos porque a técnica de PCR é simples, pode ser automatizada e requer quantidades mínimas iniciais de DNA (Caixeta et al., 2006).

Entre os marcadores baseados na técnica de PCR os SSR são os mais utilizados e mais amplamente disponíveis para o arroz até o momento, principalmente porque apresentam natureza co-dominante, ou seja, permitem a identificação dos dois alelos de um loco, são altamente informativos e são facilmente reproduzíveis, permitindo a comparação entre diferentes estudos conduzidos em diferentes laboratórios (Caixeta et al., 2006; McCouch et al, 2002). Esses marcadores amostram regiões repetidas do DNA que contêm de um a seis nucleotídeos (motivos) e que são denominadas microssatélites (Grover et al., 2007). O número de repetições dentro de um mesmo loco microssatélite é variável entre diferentes indivíduos e constitui a base genética do seu polimorfismo (Temnykh et al., 2001). As taxas de mutação nos locos microssatélites é muito alta quando comparada com regiões de DNA não repetitivo, sendo estimada em 10^{-2} a 10^{-6} eventos de mutação por loco por geração (Li et al., 2002). As altas taxas de mutação determinam uma das principais características dos marcadores SSR, o seu multi-alelismo e grande capacidade de discriminação entre indivíduos. Os mecanismos de mutação envolvidos na variação desses locos são o escorregamento da DNA polimerase durante a replicação e “crossing-over” desigual durante a recombinação (Li et al., 2002). A ocorrência desses eventos é afetada pelo tamanho do motivo, sua posição no cromossomo, conteúdo de GC e pelo tipo de divisão celular (mitótica ou meiótica). As mutações por escorregamento da DNA polimerase são provocadas por falha dos mecanismos de reparo que podem não identificar estruturas secundárias em forma de grampos que se formam durante a replicação de regiões repetidas. Isso provoca aumento ou diminuição do tamanho dos locos microssatélites. O crossing-over desigual é provocado por falha no reconhecimento das fitas homólogas de DNA nas regiões repetidas durante a recombinação e também provocam aumento ou diminuição do tamanho desses locos (Li et al., 2002).

O fato de que os locos microssatélites são muito abundantes e aleatoriamente distribuídos no genoma sempre foi bem aceito (Grover et al., 2007). No entanto, a distribuição aleatória desses locos deve ser observada com cautela. Li et al. (2002) afirmam que várias evidências apontam para o fato de que os microssatélites são abundantes em regiões não codantes do genoma e relativamente raros em regiões codantes. Morgante et al. (2002) analisaram regiões de DNA genômico e seqüências expressas (ESTs – Expressed Sequence Tags) em cinco espécies de plantas (*Arabidopsis*, arroz, soja,

milho e trigo) e verificaram que os microssatélites ocorriam em maior frequência associados a sequências expressas e que estavam, em sua maioria, em regiões não traduzidas (UTR – Untranslated Regions) dessas sequências. Grover et al. (2007) analisaram a ocorrência de locos microssatélites no genoma das duas subespécies do arroz (*indica* e *japonica*) e observaram que os motivos repetidos eram duas vezes mais frequentes nas regiões 5'-UTR dos genes em relação ao restante do genoma, e duas vezes menos frequentes nas regiões codantes que no resto do genoma, indicando um viés na distribuição desses locos. Esses resultados demonstram a contribuição importante da disponibilidade de sequências para o melhor entendimento da dinâmica de locos tão frequentemente utilizados em estudos de genética molecular em arroz.

A ampla disponibilidade das sequências do genoma do arroz promoveu a superação de uma limitação ao uso de marcadores SSR no passado, que era a necessidade da utilização de bibliotecas de DNA genômico para o desenvolvimento dos “primers”, o qual era laborioso e apresentava alto custo. (Temnykh et al., 2001). Atualmente a busca por locos microssatélites pode ser feita em sequências expressas (ESTs) e outras sequências genômicas disponíveis em bases de dados públicas. McCouch et al. (2002) desenvolveram mais de 2.000 marcadores SSR derivados de sequências genômicas provenientes do projeto de sequenciamento do genoma do arroz realizado pela Monsanto. Os marcadores desenvolvidos foram alinhados aos cromossomos do arroz e as suas posições no mapa genético foram identificadas. De fato, o sequenciamento do genoma do arroz abriu caminho para o desenvolvimento de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares capazes de amostrar qualquer região do genoma. Segundo Varshney et al. (2005), a utilização de sequências expressas (ESTs) para o desenvolvimento de marcadores SSR gênicos, ou seja, marcadores que amplificam sequências repetidas dentro de genes é uma alternativa interessante porque o desenvolvimento deste tipo de marcador é muito mais simples e barato e podem apresentar maior transferibilidade por serem desenhados a partir de regiões conservadas do genoma, sendo úteis para outras espécies para as quais sequências genômicas e gênicas ainda não estão amplamente disponíveis. Além disso, permitem acessar a variabilidade diretamente nos genes.

A utilização de bancos de dados de sequências do arroz permite a identificação de marcadores baseados em polimorfismo de vários tipos de sequências, direta ou indiretamente relacionadas a genes. O desenvolvimento de marcadores baseados em polimorfismo de elementos transponíveis (transposons) entre indivíduos é uma estratégia interessante porque atualmente se sabe que esses elementos exercem papel importante na evolução do genoma das plantas (Grzebelus,

2006) e que são importantes constituintes do genoma do arroz, estando presentes numa proporção de 35% do genoma (IRGSP, 2005). Transposons são elementos genéticos capazes de mudar a sua posição no genoma e podem ser divididos em duas classes. A classe I é representada pelos retrotransposons que se movem a partir de uma molécula intermediária de RNA e da ação da transcriptase reversa, o que significa que cada evento de transposição provoca a criação de uma nova cópia do transposon. A classe II é representada por transposons de DNA que se movimentam no genoma por um mecanismo de corte e ligação, de forma que os próprios transposons se excisam de uma região do genoma e se reintegram em outra, sem que ocorra a formação de uma cópia. Os transposons de classe II se subdividem, ainda, em transposons autônomos, que codificam todos os elementos necessários para a sua transposição (transposases, ligases, etc.), e não-autônomos, que dependem dos elementos autônomos para se transporem (Griffits, 2002; Grzebelus, 2006).

O genoma das plantas apresenta uma classe de elementos transponíveis que não se encaixa em nenhuma das duas classificações apresentadas acima e é representada por elementos invertidos repetidos denominados MITEs (Miniature Inverted Transposable Elements) (Wessler et al., 1995). Os MITEs são elementos transponíveis que poderiam ser considerados não-autônomos, pois não possuem a capacidade de se transporem por si sós. No entanto, ao contrário da maioria dos elementos não-autônomos, os MITEs são bem menores e possuem entre 100pb e 500pb de comprimento (Casa et al., 2000). O seu mecanismo de transposição não é conhecido e acredita-se que a sua atividade de transposição seja muito baixa ou que eles perderam essa capacidade. Portanto, eles não podem ser agrupados em nenhuma das classes de transposons conhecidas, embora apresentem semelhanças com elementos da classe II (Wessler et al., 1995; Grzebelus, 2006). Segundo Hu et al. (2006), os MITEs são tidos como remanescentes de outros tipos de transposons, tendo mantido suas sequências flanqueadoras. Dessa maneira, se os MITEs fossem abrir mão de algum mecanismo de transposição, eles provavelmente o fariam utilizando-se das transposases codificadas pelos seus ancestrais, uma vez que eles mesmos não são capazes de codificar transposases. Bureau et al. (1996) fizeram uma busca por elementos transponíveis no genoma do arroz e verificaram que os MITEs ocorrem com maior frequência em regiões não traduzidas de genes dessa gramínea. Portanto, a utilização desses transposons como uma classe de marcadores pode ser muito interessante, pois permite que associações com a sua presença ou ausência e características fenotípicas sejam feitas diretamente nos genes. Além disso, já se sabe que os MITEs estão presentes em um grande número de cópias no genoma (1.000 a 15.000 por genoma haplóide), o que favorece a sua utilização na construção e

saturação de mapas genéticos além de estudos de diversidade e evolução em gramíneas (Casa et al., 2000). Hu et al. (2006) fizeram uma caracterização molecular de linhagens e cultivares *O. sativa* além de 28 acessos da espécie silvestre *O. rufipogon* utilizando marcadores baseados em polimorfismo de MITEs e concluíram que as duas subespécies do arroz, *indica* e *japonica*, são resultado de dois eventos de evolução distintos a partir da ancestral *O. rufipogon*.

Estratégias de busca por fontes úteis de variação, visando o aumento dos ganhos genéticos e tolerância a estresses bióticos e abióticos, têm sido, portanto, facilitadas pela grande disponibilidade de informações disponíveis para o arroz. A enorme quantidade de marcadores moleculares disponíveis permite que mapas genéticos saturados sejam construídos e que as análises de QTLs sejam realizadas com maior precisão. Além disso, as posições dos marcadores e dos QTLs no mapa genético podem ser diretamente associadas a posições físicas, em pares de bases, permitindo a identificação de todos os genes candidatos presentes naquela região. Isso pode facilitar a utilização dos QTLs em seleção assistida e na busca por genes envolvidos na característica de interesse.

3.7 MAPEAMENTO DE QTLs E A OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE INTROGRESSÃO

A quantidade de informações disponíveis para o arroz, desde os princípios genéticos e bioquímicos envolvidos na resposta ao estresse hídrico até a disponibilidade da sequência completa do seu genoma e um grande número de genes identificados, é enorme. O maior desafio consiste na utilização dessas informações para a obtenção de resultados práticos em programas de melhoramento. Como comentado anteriormente, a introdução de genes envolvidos em processos chave na resposta ao estresse hídrico para a obtenção de plantas transgênicas pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca (Edmeades et al., 2004). No entanto, os transgênicos ainda são fonte de controvérsia, pois a sua aceitação por parte da população ainda não é realidade e existem muitos obstáculos para a aprovação de pesquisas e do cultivo dos transgênicos no Brasil e diversos outros países. Além disso, a sua obtenção e os testes necessários para a sua validação podem ser trabalhosos e levarem muito tempo para serem concluídos. Portanto, uma vez que a variabilidade genética esteja disponível dentro do conjunto gênico da espécie, ela pode ser usada nos programas de melhoramento sem que haja a necessidade da obtenção de plantas transgênicas.

O objetivo principal de um programa de melhoramento é a obtenção de variedades mais produtivas e que contenham características específicas que possibilitem o seu cultivo, com sucesso, em uma determinada região. Para tanto, o melhorista se utiliza da recombinação seguida de seleção. Através do cruzamento entre dois genótipos que contenham as características específicas de interesse, os alelos dentro de todos os locos são recombinados e uma progênie contendo um número grande de indivíduos apresentando variação entre si é obtida, permitindo que somente aqueles que apresentarem o melhor desempenho com relação às características alvo sejam selecionados (McCouch, 2004). Portanto, para que a seleção seja eficiente, a divergência entre os dois genótipos parentais deve ser a maior possível para que a recombinação seja maximizada. Segundo Breseghello et al. (1999), a base genética das linhagens de um programa de melhoramento deve ser monitorada, pois um grande número de linhagens aparentadas pode representar um tamanho efetivo restrito e um fator de risco quanto à tolerância a estresses bióticos e abióticos. O processo de domesticação das espécies cultivadas e a própria seleção exercida nos programas de melhoramento levaram a uma redução da base genética das linhagens e cultivares modernas (Gur e Zamir, 2004). Durante a domesticação uma forte pressão de seleção foi exercida sobre poucas características que eram consideradas importantes para o cultivo, como, por exemplo, maior aderência dos grãos à panícula, hábito de crescimento compacto, perda da inibição de germinação, entre outros, o que provocou uma grande perda de alelos e reduziu a base genética das populações subsequentes (Tanksley & McCouch, 1997). De acordo com Buckler et al (2001), os cereais cultivados, como milho, trigo, sorgo e arroz, foram domesticados independentemente, mas a seleção realizada pelo homem durante esse processo visava sempre às mesmas características, ou seja, plantas silvestres que produziam sementes pequenas que se dispersavam naturalmente foram selecionadas até o ponto em que passaram a produzir sementes grandes e que atendiam às necessidades de cultivo e consumo determinado pelo homem. Isso provocou uma redução da variabilidade das espécies cultivadas quando comparadas com seus ancestrais.

Sabendo que variedades cultivadas representam apenas parte da variabilidade presente em seus parentes silvestres, fica evidenciada a importância de preservá-los e utilizá-los como fonte de variabilidade genética. Segundo McCouch (2004), a importância de variedades tradicionais (representadas por materiais utilizados durante longos períodos de tempo, geralmente por pequenos agricultores, e que passaram por um processo de seleção empírico) e das espécies silvestres como fonte essencial de variabilidade para o melhoramento de plantas já é há muito tempo conhecida. No

entanto, existe um forte questionamento sobre a utilização desse germoplasma porque são menos produtivos que as cultivares modernas e possuem características que não são desejáveis aos programas de melhoramento (Gur & Zamir, 2004; McCouch, 2004). Outro problema que poder ser enfrentado pelos melhoristas é a dificuldade de se avaliar indivíduos de uma população segregante que apresentem grande variação no período de floração, altura, arquitetura de planta, etc., dificultando a determinação das diferenças entre os indivíduos. Além disso, como em um cruzamento não somente os alelos desejáveis são transferidos, é praticamente impossível identificar genótipos com maior número de alelos favoráveis com base somente em seleção visual (Hoisington et al., 1999).

Variações da metodologia de retrocruzamento associado a análise de QTL (AB-QTL – Advanced Backcross Quantitative Trait Loci Analysis) proposta por Tanksley & Nelson (1996) vêm sendo utilizadas para superar as dificuldades da utilização de espécies silvestres em programas de melhoramento (Rangel et al., 2005; McCouch et al., 2007). A metodologia de AB-QTL se baseia na obtenção de híbridos F_1 a partir do cruzamento amplo entre uma variedade cultivada e um acesso silvestre, seguido do retrocruzamento desses híbridos utilizando a variedade cultivada como parental recorrente. Dessa forma, o genoma da população derivada é constituído em sua maior parte por frações provenientes do parental cultivado e, em menor proporção, por fragmentos introgridos do parental silvestre. A população segregante obtida é utilizada para a detecção de associações entre locos marcadores mapeados e características quantitativas de interesse. Para tanto, um mapa genético saturado de marcadores moleculares deve ser obtido e a população precisa ser avaliada fenotipicamente para que a associação entre as marcas moleculares e as características quantitativas seja realizada (análise de QTL). Dessa forma, os alelos de efeito positivo provenientes do parental silvestre podem ser monitorados através de seleção assistida por marcadores, reduzindo os efeitos negativos dos cruzamentos interespecífico, como o “linkage drag”.

Um mapa genético corresponde a um modelo do arranjo linear de um grupo de locos marcadores em uma determinada espécie. Para serem mapeados, os marcadores moleculares devem possuir padrão de herança simples (Mendeliana) que possa ser detectada através das gerações. Isso porque a detecção da ligação entre dois locos se dá justamente pela verificação de que existe desequilíbrio de ligação entre eles, ou seja, que a proporção de segregação entre os locos está desviando da proporção Mendeliana esperada devido à redução da sua frequência de recombinação (Liu, 1998). A frequência de recombinação é resultado da troca de segmentos entre cromátides não irmãs durante a meiose, num fenômeno denominado “crossing-over” ou permuta genética.

Desequilíbrio de ligação é definido como o desvio das frequências alélicas em relação às frequências esperadas sob independência, indicando a existência de associação entre locos (Coelho & Silva, 2002).

O primeiro mapa genético construído com base em marcadores que detectam polimorfismo diretamente no DNA para o arroz continha 135 marcadores moleculares RFLP distribuídos nos 12 cromossomos da espécie (McCouch et al., 1988). Esse mapa foi construído com dados de segregação de 50 indivíduos F_2 provenientes do cruzamento intra-específico *indica* x *japonica* e foi um marco para os estudos genéticos em arroz, porque forneceu as primeiras ferramentas para o avanço dos estudos moleculares nessa espécie. Causse et al. (1994) publicaram um mapa construído com base em dados de segregação de uma população de retrocruzamento proveniente do cruzamento interespecífico *Oryza sativa* X *Oryza longistaminata*. Este foi o primeiro mapa construído para o arroz utilizando um cruzamento interespecífico e foi obtido através de marcadores isoenzimáticos, RAPD e RFLP. A partir daí um grande número de marcadores microssatélites (SSR) começaram a ser desenvolvidos e mapeados em arroz, aumentando consideravelmente a saturação dos mapas genéticos (Chen et al., 1997; Cho et al., 1998; Temnykh et al., 2000). Atualmente milhares de marcadores SSR estão disponíveis para o arroz (McCouch et al., 2002) e mapas genéticos cobrindo virtualmente todas as regiões do genoma podem ser construídos. Vários mapas genéticos construídos a partir de dados de segregação de diversas populações segregantes de arroz estão disponíveis na base de dados do Gramene (www.gramene.org), permitindo que sejam acessados a qualquer momento e utilizados como referência ou em estudos comparativos com outros mapas genéticos de arroz ou outras gramíneas. Além disso, é possível acessar as posições físicas (em pares de bases) de virtualmente todos os marcadores moleculares disponíveis para arroz, o que permite que as posições destes marcadores no mapa genético, em centimorgans, sejam rapidamente associadas às suas posições no mapa físico do arroz.

Mapas genéticos servem como ponto de partida para a identificação de locos associados à características quantitativas (QTLs) (Liu, 1998). Embora o mapa genético não seja necessário para a simples identificação da associação entre um marcador e uma característica quantitativa, a sua construção é essencial para se estimar adequadamente a localização do QTL no genoma e o seu efeito, sem que as duas estimativas sejam confundidas (Coelho, 2000). Um QTL pode ser definido como uma região do genoma que é responsável pela variação de um determinado carácter quantitativo. A detecção da presença de um QTL no genoma é feita através da busca por associações significativas entre o valor fenotípico de uma determinada população para o carácter quantitativo de

interesse e o genótipo desta mesma população para um ou mais marcadores genéticos (Doerge, 2002). As metodologias utilizadas para a detecção de QTLs fundamentam-se no mesmo princípio básico das análises de mapeamento, ou seja, na existência de desequilíbrio de ligação, mas, neste caso, entre o marcador e o QTL.

Uma busca por QTLs relacionados a características avaliadas sob estresse hídrico e osmótico em arroz revela uma grande quantidade de trabalhos realizados em diversos tipos de população (www.plantstress.com). O website Plantstress é uma base de dados que contém informações relevantes sobre estresses ambientais em plantas cultivadas e constitui uma ferramenta interessante para a busca por informações relacionadas às respostas aos mais diversos tipos de estresses e trabalhos envolvendo o estudo de características relacionadas a esses estresses. Segundo esta base de dados, 13 trabalhos realizados em arroz detectaram QTLs para características de desenvolvimento de raiz sob estresse hídrico (Champoux et al., 1995; Ray et al., 1996; Price & Tomos, 1997; Yadav et al., 1997; Ali et al., 2000; Price et al., 2000; Zheng et al., 2000; Zhang et al., 2001; Venuprasad et al., 2002; Kamoshita et al., 2002a; Kamoshita et al., 2002b; Zheng et al., 2003; Steele et al., 2006). Também estão listados trabalhos que identificaram QTLs para características relacionadas ao ajuste osmótico na seca (Lilley et al., 1996; Zhang et al., 2001), ao enrolamento das folhas e eficiência do uso da água (Courtois et al., 2000; Hemamalini et al., 2000; Price et al., 2002b; Manickavelu et al., 2006; Yue et al., 2006; Zhang et al., 2006), nível de ácido abscísico (ABA) (Quarrie et al., 1997) e produção de grãos e seus componentes na seca (Babu et al., 2003; Lafitte et al., 2004; Lanceras et al., 2004; Xu et al., 2005; Yue et al., 2006; Manickavelu et al., 2006; Zou et al., 2006; Kumar et al., 2007).

Price & Tomos (1997) avaliaram uma população F_2 derivada de um cruzamento intra-específico Bala (*indica*) X Azucena (*japonica*) para características relacionadas ao desenvolvimento de raiz sob estresse hídrico em casa de vegetação e identificaram dez QTLs para comprimento, três para volume e três para diâmetro de raiz. Comparando os QTLs identificados no seu trabalho com outros previamente identificados para características de raiz em uma população de linhas puras recombinantes também proveniente de um cruzamento intra-específico usando as cultivares Co39 (*indica*) e Moroberekan (*japonica*) (Champoux et al., 1995; Ray et al., 1996), os autores verificaram que um QTL para crescimento de raiz foi identificado na mesma região do cromossomo 11 nos três trabalhos. Price & Tomos (1997) afirmaram que esse QTL deve ter grande efeito no desenvolvimento de raiz sob estresse hídrico uma vez que foi identificado em duas populações diferentes e em três ambientes. Yadav et al. (1997) avaliaram uma população duplo-haplóide do cruzamento intra-

específico IR64 (*indica*) X Azucena (*japonica*) e mapearam um grande número de QTLs relacionados a características de raiz medidas sob estresse hídrico em casa de vegetação. Foram identificados seis QTLs para peso total de raiz, cinco para peso de raízes profundas (entre 30cm e 90cm de profundidade), nove para proporção entre peso de raízes profundas e peso da parte aérea, seis para peso de raízes profundas por perfilho, oito para comprimento de raiz e cinco para diâmetro de raiz. Esses autores também fizeram uma comparação entre os QTLs encontrados no seu trabalho e os QTLs identificados para a população Co39 X Moroberekan (Champoux et al., 1995) e verificaram a presença de QTLs comuns para as duas populações nos cromossomos 1, 4, 7, 8 e 9.

Ali et al. (2000) mapearam QTLs para características relacionadas à penetrabilidade de raízes em uma camada de resistência no solo em experimentos conduzidos em casa de vegetação, em duas épocas, em uma população de linhas puras recombinantes derivadas de um cruzamento *indica* X *indica* (IR58821 X IR52561). Um total de 28 QTLs foram identificados para as características número total de raízes, número de raízes que penetraram a camada de resistência, índice de penetração das raízes, diâmetro das raízes que penetraram a camada de resistência e comprimento das raízes que penetraram. Price et al. (2000) também avaliaram a capacidade penetração das raízes em uma população de linhas puras recombinantes derivadas do cruzamento Bala X Azucena e detectaram um QTL para a característica número de perfilhos, três QTLs para número total de raízes e sete para número de raízes que penetraram a camada de resistência. Os autores comparam esses QTLs com outros previamente identificados para capacidade de penetração de raízes em outra população, Co39 X Moroberekan (Ray et al., 1996), e não encontraram nenhum QTL comum entre os dois trabalhos. Price et al. (2000) afirmaram que, por se tratarem de populações diferentes avaliadas em ambientes diferentes, é esperado que não sejam encontrados QTLs comuns. A capacidade de penetração de raízes também foi avaliada por Zheng et al. (2000) na população duplo-haplóide IR64 X Azucena em casa de vegetação. Foram identificados dois QTLs para número de raízes que penetraram a camada de resistência no solo, dois para número total de raízes, quatro para índice de penetração das raízes e quatro para diâmetro das raízes que penetraram a camada de resistência. A comparação com QTLs previamente identificados na população Co39 X Moroberekan (Ray et al., 1996) revelou um QTL comum de grande efeito no cromossomo 2 para índice de penetração das raízes. Outra comparação foi feita com o trabalho de Yadav et al. (1997) que utilizou a mesma população IR64 X Azucena e foi verificado um QTL comum para diâmetro de raiz no cromossomo 1. Zhang et al. (2001) avaliaram uma população duplo-haplóide do cruzamento intra-específico CT9993 (*japonica*) X IR62266 (*indica*) em

casa de vegetação e detectaram um total de 36 QTLs para características relacionadas à capacidade de penetração das raízes. Foram identificados quatro QTLs para índice de penetração das raízes, seis para diâmetro basal das raízes, onze para diâmetro das raízes que penetraram a camada de resistência do solo, seis para resistência ao arranque, cinco para peso da matéria das raízes, três para peso da matéria seca das raízes que penetraram a camada de resistência e um para comprimento das raízes que penetraram. Um QTL de grande efeito mapeado no cromossomo 4 para índice de penetração das raízes era comum a outros dois QTLs identificados nas populações Co39 X Moroberekan (Ray et al., 1996) e na população IR64 X Azucena (Zheng et al., 2000). QTLs comuns, localizados na mesma região do cromossomo 4, para diâmetro basal das raízes foram identificados nas populações IR64 X Azucena (Zheng et al., 2000) e Co39 X Moroberekan (Champoux et al., 1995). Além disso, QTLs comuns ao QTL mapeado por Zhang et al. (2001) no cromossomo 1 para a característica diâmetro das raízes que penetraram a camada de resistência do solo foram identificados em três trabalhos (Champoux et al. 1995; Yadav et al. 1997; Zheng et al. 2000). Venuprasad et al. (2002) avaliaram a população duplo-haplóide IR64 X Azucena sob duas condições em campo experimental, uma com disponibilidade total de água e outra sob déficit hídrico, e identificaram quatro QTLs para características de raiz (um para diâmetro de raiz, um para volume de raiz, um para peso da matéria seca da raiz e um para comprimento de raiz).

Kamoshita et al. (2002a) mapearam QTLs para características de raiz em quatro experimentos conduzidos em casa de vegetação utilizando a população CT9993 X IR62266 e identificaram oito QTLs para massa seca da parte aérea da planta, oito para massa seca da raiz, oito para proporção de raízes profundas, sete para número de raízes por perfilho, nove para número de raízes profundas e onze para diâmetro da raiz. Segundo esses autores, três QTLs relacionados à morfologia de raiz mapeados nos cromossomos 1, 2 e 5 e dois QTLs para diâmetro de raiz mapeados nos cromossomos 2 e 4 foram consistentes nos quatro experimentos. Kamoshita et al. (2002b) avaliaram uma população *indica* X *indica* (IR58821 X IR52561) em casa de vegetação e identificaram dois QTLs para massa seca da parte aérea da planta, cinco para massa seca da raiz, cinco para proporção de raízes profundas, seis para número de raízes por perfilho, cinco para comprimento das raízes profundas e oito para diâmetro da raiz. Esses autores fizeram uma comparação dos QTLs identificados com outros previamente identificados nas populações CT9993 X IR62266 (Kamoshita et al., 2002a), IR64 X Azucena (Yadav et al., 1997), Bala X Azucena (Price & Tomos, 1997) e Co39 X Moroberekan (Champoux et al., 1995) e verificaram que 12 dos QTLs identificados no seu trabalho também foram identificados em pelo

menos uma dessas populações. Zheng et al. (2003) identificaram um total de 18 QTLs para as características comprimento de raiz, número de raízes adventícias, comprimento da raiz lateral e número de raízes laterais em uma população de linhas puras recombinantes do cruzamento intra-específico IR1552 (*indica*) X Azucena (*japonica*) avaliadas em casa de vegetação. A comparação dos QTLs identificados neste trabalho com os QTLs identificados nas populações IR64 X Azucena (Yadav et al., 1997) e Bala X Azucena (Price et al., 2002a) revelou QTLs comuns, nos três trabalhos, para comprimento de raiz nos cromossomo 1, 2 e 9. Steele et al. (2006) desenvolveram 22 linhas isogênicas contendo regiões do genoma introgrididas da cultivar Azucena no background genético de uma cultivar de arroz de terras altas indiana denominada Kalinga III. Esses autores realizaram retrocruzamento assistido por marcadores para introgridir quatro regiões que haviam previamente sido associadas a QTLs para características de raiz em outras populações que tinham a Azucena como um dos parentais. Foi verificado que as linhas isogênicas obtidas, apesar de conterem todas as quatro regiões alvo, só apresentaram aumento do comprimento de raiz, característica que estava relacionada a apenas uma das regiões.

Lilley et al. (1996) identificaram cinco QTLs para ajuste osmótico em uma população de linhas puras recombinantes do cruzamento Co39 X Moroberekan avaliada em casa de vegetação. Zhang et al. (2001) avaliaram a população CT9993 X IR62266 em casa de vegetação para características relacionadas à capacidade de penetração das raízes e também para ajuste osmótico. Foram identificados cinco QTLs para ajuste osmótico e uma comparação com os QTLs detectados em Lilley et al. (1996) revelou um QTL comum mapeado no cromossomo 8. Courtois et al. (2000) avaliaram uma população duplo-haplóide do cruzamento IR64 X Azucena em campo experimental em três ensaios com diferentes níveis de disponibilidade de água, e identificaram um total de onze QTLs para enrolamento das folhas, dez para ressecamento das folhas e onze para conteúdo relativo de água. Destes QTLs, três foram identificados nos três ensaios e quatro foram identificados em dois ensaios. Hemamalini et al. (2000) avaliaram uma população duplo-haplóide do cruzamento IR64 X Azucena em campo experimental para diversas características de raiz e para enrolamento das folhas. Foram identificados cinco QTLs para comprimento de raiz, dez para número total de raízes, cinco para volume de raiz, seis para diâmetro de raiz, dois para massa seca de raiz e um para enrolamento das folhas. Price et al. (2002b) avaliaram uma população de linhas puras recombinantes do cruzamento Bala X Azucena em campo experimental em dois ambientes e durante dois anos. Foram mapeados cinco QTLs para enrolamento das folhas, onze para ressecamento das folhas e oito para conteúdo

relativo de água. Os QTLs mapeados foram comparados aos detectados em outros trabalhos e QTLs comuns para enrolamento das folhas nos cromossomos 5 e 7 foram identificados na população Bala X Azucena (Courtois et al., 2000). Manickavelu et al. (2006) avaliaram uma população de linhas puras recombinantes do cruzamento IR58821 X IR52561 (*indica* X *indica*) para características relacionadas à produção e à eficiência do uso da água sob estresse hídrico. Foram identificados dois QTLs para enrolamento das folhas e um para conteúdo relativo de água. Yue et al. (2006) também avaliaram características relacionadas à produção e à eficiência do uso da água sob estresse hídrico, mas em uma população de linhas puras recombinantes de um cruzamento intra-específico Zenshan97 (*indica*) X IRAT109 (*japonica*). Foram mapeados quatro QTLs para enrolamento das folhas e três para ressecamento das folhas. Zhang et al. (2006) avaliaram linhagens de introgressão contendo fragmentos genômicos da espécie silvestre *O. rufipogon* quanto à tolerância ao estresse osmótico e identificaram 12 marcadores moleculares (QTLs) relacionados à tolerância medida pelo grau de enrolamento das folhas. Os autores identificaram uma linhagem que apresentou baixo nível de enrolamento das folhas e mostrou-se bastante tolerante ao estresse osmótico e afirmaram que a identificação desta linhagem tolerante serve de base para a utilização de espécies silvestres como doadoras de genes para a tolerância à seca. Quarrie et al. (1997) avaliaram uma população F₂ do cruzamento IR20 (*indica*) X 63-83 (*japonica*) e identificaram dez QTLs para acúmulo de ácido abscísico sob estresse hídrico.

Babu et al. (2003) avaliaram a população duplo-haplóide CT9993 X IR62266 em campo experimental para características de raiz, para ajuste osmótico, enrolamento das folhas e para características relacionadas à produção em três níveis de disponibilidade de água e identificaram 47 QTLs. QTLs identificados no cromossomo 4 para altura de planta, produção de grãos e esterilidade de espiguetas foram mapeados na mesma região onde QTLs para características de raiz haviam sido previamente mapeados (Zhang et al., 2001, Kamoshita et al., 2002). Lafitte et al. (2004) avaliaram a população Bala X Azucena em campo experimental sob estresse hídrico e identificaram 30 QTLs para produção e seus componentes. Lancera et al. (2004) avaliaram a população CT9993 X IR62266 e identificaram um total de 77 QTLs para componentes de produção avaliados sob estresse hídrico. Xu et al. (2005) avaliaram linhagens de introgressão provenientes do cruzamento entre uma cultivar chinesa da subespécie *indica* denominada Teqing e uma cultivar americana da subespécie *japonica* denominada Lemont em campo experimental e identificaram 36 QTLs para características relacionadas à produção sob estresse hídrico. Manickavelu et al. (2006) avaliaram a população

IR58821 X IR52561 para características relacionadas à produção e à eficiência do uso da água sob estresse hídrico identificaram dez QTLs para características de produção sob estresse hídrico e nove para produção sob condições ideais de irrigação. Yue et al. (2006), que avaliaram a população Zenshan97 X IRAT109 para características relacionadas à produção e à eficiência do uso da água sob estresse hídrico detectaram 27 QTLs para produção e seus componentes sob estresse hídrico. Zou et al. (2006) identificaram 36 QTLs para produção de grãos e seus componentes avaliados sob duas condições em campo experimental (com irrigação e sob estresse hídrico) em uma população de linhas puras recombinantes do cruzamento Zhenshan97 X IRAT109. Kumar et al. (2007) avaliaram a população CT9993 X IR62266 e identificaram 18 QTLs para características de produção sob estresse hídrico. Um QTL para produção sob estresse foi mapeado no cromossomo 1 numa região que já havia sido relacionada a número de grãos por panícula, número de panículas, peso da matéria seca de raízes, enrolamento das folhas, e ressecamento das folhas nessa mesma população (Zhang et al., 2001; Babu et al., 2003; Lanceras et al., 2004). Um QTL para atraso na floração foi mapeado numa região do cromossomo 6 onde QTLs para produção sob estresse (Lanceras et al., 2004), peso da massa seca da parte aérea (Kamoshita et al., 2002) e ressecamento das folhas (Babu et al., 2003).

Os trabalhos revisados acima avaliaram, em sua maioria, populações de cruzamentos intra-específicos, sendo que algumas dessas populações foram avaliadas em mais de um trabalho, possibilitando uma comparação entre QTLs detectados em diferentes ambientes. Levando-se em consideração o grande número de QTLs detectados, um número muito pequeno desses QTLs foi comum entre dois ambientes. Isso revela a forte influência do ambiente sobre a expressão de características relacionadas à seca e sobre a produção avaliada sob estresse hídrico. Devido ao fato de um número limitado de genitores ter sido utilizado em todos esses trabalhos, pode ser considerado que apenas uma pequena porção da variabilidade existente no conjunto gênico da espécie para características relacionadas à tolerância à seca está sendo explorada. Em apenas um deles (Zhang et al., 2006) a variabilidade potencial para tolerância à seca das espécies silvestres foi explorada. Como comentado anteriormente, vários QTLs associados ao aumento de características relacionadas à produtividade foram detectados em populações provenientes de cruzamentos interespecíficos em arroz (*Oryza glumaepatula* – Brondani et al., 2002; *Oryza rufipogon* – Xiao et al., 1998; Moncada et al., 2001; Septiningsih et al., 2003; Thomson et al., 2003). Esses estudos identificaram regiões do genoma provenientes do parental silvestre associadas positivamente a características relacionadas à produção e verificaram a presença de segregantes transgressivos, ou seja, indivíduos que

apresentavam melhor performance que o melhor parental, evidenciando o potencial das espécies silvestres.

Segundo Tuberosa & Salvi (2006) a genética molecular e a genômica podem ser efetivamente úteis aos programas de melhoramento uma vez que os alelos favoráveis identificados nos QTLs possam ser utilizados na predição da relação entre genótipo e fenótipo. No caso da utilização de espécies silvestres como fonte de alelos de tolerância à seca, a análise de QTLs permite não só a identificação das regiões genômicas associadas às características avaliadas como também dos alelos que apresentam efeitos positivos em cada loco. Isso permite que os genótipos que possuam os alelos favoráveis nas regiões de interesse sejam identificados através da seleção assistida. Os fragmentos genômicos contendo os alelos de efeito positivo identificados pela análise de QTLs podem então ser monitorados através das gerações para a obtenção de linhagens de introgressão, ou seja, linhagens que contenham somente os alelos de efeito positivo provenientes do parental silvestre no background genético de um genótipo elite. Essa estratégia reduz os efeitos negativos de cruzamentos interespecíficos, conforme comentado anteriormente. Linhagens de introgressão (ILs – Introgression Lines) estão se tornando um material muito útil para estudos de genética molecular associados ao melhoramento de plantas. Essas linhagens normalmente são obtidas após algumas gerações de autofecundação de populações de retrocruzamento provenientes de cruzamentos amplos (inter ou subespecíficos). Por apresentarem background genético simples, composto por regiões cromossômicas provenientes de apenas dois parentais, elas podem ser usadas para a avaliação de interações gênicas em experimentos conduzidos em vários locais e anos e, principalmente, para a elucidação da contribuição dos fragmentos silvestres para as características quantitativas avaliadas. ILs contendo fragmentos genômicos da *O. rufipogon* foram desenvolvidas e todos os trabalhos demonstraram que os alelos silvestres contribuem positivamente com características para as características avaliadas, corroborando os resultados de estudos de QTL realizados anteriormente e demonstrando o potencial dessas linhagens como material genético que pode ser utilizado para melhor entender os efeitos das introgressões (Tian et al., 2006; Cheema et al., 2007; Semagn et al., 2007; Tan et al., 2007). As introgressões contidas nas ILs podem ser identificadas e selecionadas com marcadores moleculares, de forma que as introgressões de efeito positivo podem ser mantidas e as indesejáveis eliminadas, aumentando a eficiência da incorporação de variabilidade nas linhagens dos programas de melhoramento.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali ML, Pathan MS, Zhang J, Bai G, Sarkarung S, Nguyen HT. Mapping QTLs for root traits in a recombinant inbred population from two *indica* ecotypes in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 101:756-766. 2000.
- Akimoto M, Shimamoto Y, Morishima H. Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by its life-history traits. *Molecular Ecology*. 7:1371-1381. 1998.
- Babu RC, Nguyen BD, Chamarek V, Shanmugasundaram P, Chezian P, Jeyaprakash P, Ganesh SK, Palchamy A, Sadasivam S, Sarkarung S, Wade LJ, Nguyen HT. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: association between secondary traits and field performance. *Crop Science*. 43:1457-1469. 2003.
- Bennetzen J. Opening the door to comparative plant biology. *Science*. 296:60-63. 2002.
- Bolaños J, Edmeades GO, Martinez L. Mejoramiento para tolerancia a sequía en maíz tropical: la experiencia del CIMMYT. XVIII Congresso Nacional de Maíz y Sorgo, Vitória-ES-Brasil. 1990.
- Brar DS, Kush GS. Alien introgression in rice. *Plant Molecular Biology*. 35:35-47. 1997.
- Breseghele F, Rangel PHN, Morais OP. Ganho de produtividade pelo melhoramento genético do arroz irrigado no Nordeste do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 34:399-407. 1999.
- Brondani C, Brondani RPV, Rangel, PHN, Ferreira, ME. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the inter-specific cross *Oryza glumaepatula* X *Oryza sativa*. *Hereditas* 134:59-71. 2001.
- 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.
- Brondani RPV, Zucchi MI, Brondani C, Rangel PHN, Borba TCO, Rangel PN, Magalhães MR, Vencovsky R. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica*. 125:115-123. 2005
- Bota J, Flexas J, Medrano H. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist*. 162:671-681. 2004.
- Bowler C, Montagu MV, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43:83-116. 1992.

- Buckler E, Thornsberry JM, Kresovich S. Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genetical Research*. 77:213-218. 2001.
- Caixeta ET, Oliveira ACB, Brito GG, Sakiyama NS. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém A, Caixeta ET (eds.). *Marcadores moleculares*. 1ed. UFV: Viçosa, MG. 2006. p. 9-78.
- Casa AM, Brower C, Nagel A, Wang L, Zhang Q, Kresovich S, Wessler SR. The MITE family *hartbreaker* (*Hbr*): molecular markers in maize. *Proceedings of the National Academy of Science: USA*. 97:10083-10089. 2000.
- Cause MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR, Tanksley SD. Saturated molecular map of the rice genome based on an inter-specific backcross population. *Genetics*. 138:1251-1274. 1994.
- Champoux MC, Wang G, Sarkarung S, Mackill DJ, O'Toole JC, Huang N, McCouch SR. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 90:969-81. 1995.
- Chaves MM, Oliveira MM. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. 55:2365-2384. 2004.
- Cheema KK, Bains NS, Mangat GS, Das A, Vikal Y, Brar DS, Khush GS, Singh K. Development of high yielding IR64 X *Oryza rufipogon* (Griff.) introgression lines and identification of introgressed alien chromosome segments using SSR markers. *Euphytica*. On line first. 2007.
- Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 95:553-567. 1997.
- Cho YG, McCouch SR, Kuiper M, Kang MR, Pot J, Groenen JTM, Eun MY. Integrated map of AFLP, SSLP and RFLP markers using a recombinant inbred population of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 97:370-380. 1998.
- Coelho, A. S. G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: Pinheiro, J. B.; Carneiro, I. F. *Análise de QTL no melhoramento de plantas*. Goiânia: UFG, 2000. p. 1-62.
- Coelho ASG, Silva HD. *Construção de mapas genéticos e mapeamento de QTLs*. Piracicaba, SP. 2002.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brower JB, Pang ECK. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*. 142:169-196. 2005.

- Courtois B, McLaren G, Sinha PK, Prasad K, Yadav R, Shen L. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice. *Molecular Breeding*. 6:55-66. 2000.
- Doerge RW. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews: Genetics*. 3:43-52. 2002.
- Duan S, Lu B, Li Z, Tong J, Kong J, Yao W, Li S, Zhu Y. Phylogenetic analysis of AA-genome *Oryza* species (Poaceae) based on chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Biochemical Genetics*. 45:113-129. 2007.
- Edmeades GO, McMaster GS, White JW, Campos H. Genomics and the physiologist: bridging the gap between genes and crop response. 90:5-18. 2004.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de produção, N° 1. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 29 de outubro de 2007.
- Embrapa – Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de produção, N° 3. 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 21 de outubro de 2007.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Audiência pública debate políticas para o arroz e o feijão. 2007. Disponível em: www.embrapa.br. Acesso em: 27 de outubro de 2007.
- FAO – Food and Agriculture Organization. Global information and early warning system on food and agriculture. 2003. Disponível em: www.fao.org. Acesso em: 27 de outubro de 2007.
- FAO – Food and Agriculture Organization. FAO STATS. 2006. Disponível em: www.faostat.fao.org. Acesso em: 30 de fevereiro de 2008.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.
- Fukai S, Cooper M. Development of drought-resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Research*. 40:67-86. 1995.
- Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*. 169:1631-1638. 2005.
- Ge S, Sang T, Lu BR, and Hong DY. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 96:14400-14405. 1999a.
- Ge S, Oliveira GCX, Schaal BA, Gao LZ, Hong DY. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*. 82:638-644. 1999b.

- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science*. 296:92-100. 2002.
- Gomez SM, Kumar SS, Jeyaprakash P, Suresh R, Biji KR, Boopathi NM, Price AH, Babu RC. Mapping QTLs linked to physio-morphological and plant production traits under drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) in the target environment. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2:161-169. 2006.
- Gowda M, Venu RC, Roopalakshmi K, Sreerekha MV, Kulkarni RS. Advances in rice breeding, genetics and genomics. *Molecular Breeding*. 11:337-352. 2003.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*. 388:151-157. 2005.
- Grover A, Aishwarya V, Sharma PC. Biased distribution of microsatellite motifs in the rice genome. *Molecular Genetics and Genomics*. 277:469-480. 2007.
- Grzebelus D. Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers. *Journal of fruit and ornamental plant research*. 14:21-29. 2006.
- Guimarães CM, Santos AB, Magalhães AM, Stone LF. Sistemas de cultivo. In: Santos AB, Stone LF, Vieira NR (eds). *A cultura do arroz no Brasil*. 2ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2006, Capítulo 3, pg. 53-96.
- Gur A, Zamir D. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *Plos Biology*. 2:1610-1615. 2004.
- Haley CS, Knott SA. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*. 69:315-324. 1992.
- Hemamalini GS, Shashidhar HE, Hittalmani S. Molecular marker assisted tagging of morphological and physiological traits under two contrasting moisture regimes at peak vegetative stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 112:69-78. 2000.
- Kawakami S, Eban K, Nishikawa T, Sato Y, Vaughan DA, Kadowaki K. Genetic variation in the chloroplast genome suggests multiple domestication of cultivated Asian rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*. 50:180-187. 2007.
- Kush GS, Brar DS. *Biotechnology for rice breeding: progress and potential impact*. FAO: The international rice commission. 2002. Available at: <http://www.fao.org>. Acesso em: 29 de setembro de 2007.

- Lafitte HR, Price AH, Courtois B. Yield response to water deficit in an upland rice mapping population: associations among traits and genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 109:1237-1246. 2004.
- Lafitte HR, Li ZK, Vijayakumar CHM, Gao YM, Shi Y, Xu JL, Fu BY, Yu SB, Ali AJ, Domingo J, Maghirang R, Torres R, Mackill D. Improvement of rice drought tolerance through backcross breeding: evaluation of donors and selection in drought nurseries. *Field Crops Research*. 97:77-86. 2006.
- Lanceras JC, Pantuwan G, Jongdee B, Toojinda T. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiology*. 135:384-399. 2004.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 11:2453-2465. 2002.
- Lilley JM, Ludlow MM, McCouch SR, O'Toole JC. Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*. 47:1427-1446. 1996.
- Liu, B. H. *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 1998. 611 p.
- Liu L, Lafitte R, Guan D. Wild *Oryza* species as potential sources of drought-adaptive traits. *Euphytica*. 138:149-161. 2004.
- Londo JP, Chiang YC, Hung KH, Chiang TY, Schaal BA. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *PNAS*. 103:9578-9583. 2006.
- Ma J, Bennetzen JL. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 101:12024-12410. 2004.
- Maclean JL, Dawe DC, Hardy B, Hetter GP. *Rice Almanac*. 3ed: IRRI, Los Baños, Phillipines. p. 59-235. 2002.
- Manickavelu A, Nadarajan N, Ganesh SK, Gnanamalar RP, Babu RC. Drought tolerance in rice: morphological and molecular genetic consideration. *Plant Growth Regulation*. 50:121-138. 2006.
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Kush GS, Coffman WR, Tanksley SD. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*. 76:815-829. 1988.
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Wlaton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*. 9:199-207. 2002.
- McCouch S. Diversifying selection in plant breeding. *Plos Biology*. 2:1507-1512. 2004.

- McCouch SR, Sweeney M, Li J, Jiang H, Thomson M, Septiningsih E, Edwards J, Moncada P, Xiao J, Garris A, Tai T, Martinez C, Tohme J, Sugiono M, McClung A, Yuan LP, Ahn SN. Through the genetic bottleneck: *O. rufipogon* as a source of trait-enhancing alleles for *O. sativa*. *Euphytica*. 154:317-339. 2007.
- McKersie BD. Oxidative stress. 1996. Disponível em: <http://www.plantstress.com/Articles/index.asp>. Acesso em: 04 de janeiro de 2008.
- Moncada P, Martínez CP, Borrero J, Chatel M, Gauch Jr H, Guimarães E, Tohme J, McCouch SR. Quantitative trait loci for yield components in an *Oryza sativa* X *Oryza rufipogon* BC₂F₂ population evaluated in an upland environment. *Theoretical and Applied Genetics*. 102:41-52. 2001.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*. 30:194-200. 2002.
- Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 55:335-350. 1987.
- Nakayama, S. Molecular cytological diversity in cultivated rice *Oryza sativa* subspecies *japonica* and *indica*. *Breeding Science*. 55:425-430. 2005.
- Naredo MEB, Vaughan DA, Cruz FS. Comparative spikelet morphology of *Oryza schlechteri* Pilger and related species of *Leersia* and *Oryza* (Poaceae). *Journal of Plant Research*. 106:109-112. 1993.
- Naredo MEB, Juliano AB, Lu BR, Jackson MT. Taxonomic status of *Oryza glumaepatula* Steud. II. Hybridization between New World diploids and AA genome species from Asia and Australia. Santos AB, Stone LF, Vieira NR (eds). *A cultura do arroz no Brasil*. 2ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2006, Capítulo 1, pg. 17-30.
- Nguyen HT, Babu RC, Blum A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Science*. 37:1426-1437. 1997. *Theoretical and Applied Genetics*. 106:583-593. 2003.
- Paterson AH, Freeling M, Sasaki T. Grains of knowledge: genomics of model cereals. *Genome Research*. 15:1643-1650. 2005.
- Price AH, Steele KA, Moore BJ, Barraclough PB, Clark LJ. A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice (*Oryza sativa* L.) used to identify QTLs for root penetration ability. *Theoretical and Applied Genetics*. 100:49-56. 2000.

- Price AH, Steele KA, Moore BJ, Jones RGW. Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes. II. Mapping quantitative trait loci for root morphology and distribution. *Field Crops Research*. 76:25-43. 2002a.
- Price AH, Townend J, Jones MP, Audebert A, Courtois B. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice grown in the Philippines and West Africa. *Plant Molecular Biology*. 48:683–695. 2002b.
- Rangel PHN, Brondani C, Rangel PN, Brondani RPV, Zimmermann FJP. Development of rice lines with gene introgression from the wild *Oryza glumaepatula* by the AB-QTL methodology. *CBAB* 5:10-21. 2005.
- Ray JD, Yu L, McCouch SR, Champoux MC, Wang G, Nguyen HT. Mapping quantitative trait loci associated with root penetration ability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 92:627-636. 1996.
- Ronald P, Leung Hei. The most precious things are not jades and pearls. *Science*. 296:58-59. 2002.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologia Vegetal*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 906p.
- Rubim MAL. A case study on life-history of wild rice: from germination to emergence of inflorescence. In: Morishima H; Martins PS. Investigations of plant genetic resources in the Amazon Basin with the emphasis on the genus *Oryza*. Report of 1992/93 Amazon project. 100p. 1994.
- Sarla N, Swamy BPM. *Oryza glaberrima*: A source for the improvement of *Oryza sativa*. *Current Science*. 89:955-963. 2005.
- Semagn K, Ndjiondjop MN, LorieuxM, Cissoko M, Jones M, McCouch S. Molecular profiling of an inter-specific rice population derived from a cross between WAB56-104 (*Oryza sativa*) and CG14 (*Oryza glaberrima*). *African Journal of Biotechnology*. 6:2014-2022. 2007.
- Septiningsih EM, Prasetyono J, Lubis E, Tai TH, Tjubaryat T, Moeljopawiro S, McCouch SR. Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. *Theoretical and Applied Genetics*. 107:1419-1432. 2003.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 58:221-227. 2007.

- Steele KA, Price AH, Shashidhar HE, Witecombe JR. Marker-assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. *Theoretical and Applied Genetics*. 112:208-221. 2006.
- Sweeney M, McCouch S. The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*. 1-7. 2007.
- Su J, Wu R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Science*. 166:941-948. 2004.
- Tan L, Liu F, Xue W, Wang G, Ye S, Zhu Z, Fu Y, Wang X, Sun C. Development of *Oryza rufipogon* and *O. sativa* introgression lines and assessment for yield-related quantitative trait loci. *Journal of Integrative Plant Biology*. 49:871-884. 2007.
- Tanksley SD, Grandillo S, Fulton T, Zamir D, Eshed Y, Petiard Y, Lopez J, Beck-Bunn T. Advanced backcross quantitative trait locus analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*. 92:213-224. 1996.
- Tanksley SD, Nelson JC. 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*. 92:191-203. 1996.
- Tanksley, S. D.; McCouch, S. R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*. 277:1063-1066. 1997.
- Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Ishii T, McCouch SR. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 100:697-712. 2000.
- Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. *Genome Research*. 11:1441-1452. 2001.
- The Rice Annotation Project. Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. *japonica* and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*. 17:175-183. 2007.
- Thomson MJ, Tai TH, McClung AM, Lai XH, Hinga ME, Lobos KB, Xu Y, Martinez CP, McCouch SR. Mapping quantitative trait loci for yield, yield components and morphological traits in an advanced backcross population between *Oryza rufipogon* and the *Oryza sativa* cultivar Jefferson. *Theoretical and Applied Genetics*. 107:479-493. 2003.

- 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.
- Tuberosa R, Salvi S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science*. 11:405-412. 2006.
- Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P, Raghuvanshi S, Gaur A, Kapur A, Gupta V, Kumar D, Ravi V, Vij S, Khurana P, Sharma S. Structural and functional analysis of rice genome. *Journal of Genetics*. 83:79-99. 2004.
- USDA (United States Department of Agriculture). Disponível em <http://plants.usda.gov/>. Acesso em 13 de julho de 2007.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*. 23:48-55. 2005.
- Vaughan DA, Kadowaki K, Kaga A, Tomooka N. On the phylogeny and biogeography of the genus *Oryza*. *Breeding Science*. 55:113-122. 2005.
- Vaughan DA, Morishima H, Kadowaki K. Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology*. 6:139-146. 2003.
- Venuprasad R, Shashidhar HE, Hittalmani S, Hemamalini GS. Tagging quantitative trait loci associated with grain yield and root morphological traits in rice (*Oryza sativa* L.) under contrasting moisture regimes. *Euphytica*. 128:293-300. 2002.
- Wessler SR, Bureau TE, White SE. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 5:814-821. 1995.
- Xiao J, Li J, Grandillo S, Ahn SN, Yuan L, Tanksley SD, McCouch SR. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics*. 150:899-909. 1998.
- Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM. Identification of drought tolerant determinants by genetic analysis of root response to drought stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology*. 142:1065-1074. 2006.
- Xu JL, Lafitte HR, Gao YM, Fu BY, Torres R, Li ZK. QTLs for drought escape and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 111:1642-1650. 2005.
- Xu Y, McCouch SR, Zhang Q. How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? *Plant Molecular Biology*. 59:7-26. 2005.

- Yadav R, Courtois B, Huang N, McLaren G. Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a doubled-haploid population in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 94:619-632. 1997.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GKS, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *Science*. 296:79-92. 2002.
- Yue B, Xue W, Xiong L, Yu X, Luo L, Cui K, Jin D, Xing Y, Zhang Q. Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. *Genetics*. 172:1213-1228. 2006.
- Zeng ZB. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proceedings of National Academic of Science USA*. 90:10972-10976. 1993.
- Zeng ZB. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*. 136:1457-1468. 1994.
- Zhang J, Zheng HG, Aarti A, Pantuwan G, Nguyen TT, Tripathy JN, Sorial AK, Robin S, Babu RC, Nguyen BD, Sarkarung S, Blum A, Nguyen HT. Locating genomic regions associated with components of drought resistance in rice: comparative mapping within and across species. *Theoretical and Applied Genetics*. 103:19-29. 2001.
- Zhang X, Zhou S, Fu Y, Su Z, Wang X, Sun C. Identification of a drought tolerant introgression line derived from Dongxiang common wild rice (*O. rufipogon* Griff.). *Plant Molecular Biology*. 62:247-259. 2006.
- Zhang S, Gu YQ, Singh J, Coleman-Derr D, Brar DS, Jiang N, Lemaux PG. New insights into *Oryza* genome evolution: high gene colinearity and differential retrotransposon amplification. *Plant Molecular Biology*. 64:589-600. 2007.
- Zheng HG, Babu RC, Pathan MS, Ali L, Huang N, Courtois B, Nguyen HT. Quantitative trait loci for root-penetration ability and root thickness in rice: comparison of genetic backgrounds. *Genome*. 43:53-61. 2000.
- Zheng BS, Yang L, Zhang WP, Mao CZ, Wu YR, Yi KK, Liu FY, Wu P. Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water-supply conditions and comparative analysis across three populations. *Theoretical and Applied Genetics*. 107:1505-1515. 2003.
- Zhou J, Wang X, Jiao Y, Qin Y, Liu X, He K, Chen C, Ma L, Wang J, Xiong L, Zhang Q, Fan L, Deng XW. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Molecular Biology*. 63:591-608. 2007.

Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 53:247-273. 2002.

Zhu Q, Ge S. Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus *Oryza* revealed by intron sequences of four nuclear genes. *New Phytologist*. 167:249-265. 2005.

Zou GH, Mei HW, Liu HY, Liu GL, Hu SP, Yu XQ, Li MS, Wu JH, Luo LJ. Grain yield responses to moisture regimes in a rice population: association among traits and genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 112:106-113. 2005.

5 ARTIGO 1

AGRONOMIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF INTROGRESSION LINES FROM THE INTER-SPECIFIC CROSS *Oryza sativa* (BG 90-2) x *Oryza glumaepatula* (RS-16).

Observação: Artigo NO PRELO na revista Genetics and Molecular Research.

ABSTRACT

The reduced genetic variability of modern rice varieties (*Oryza sativa*) is of concern because it reduces the possibilities of genetic gain in breeding programs. Introgression lines (ILs) containing genomic fragments from wild rice can be used to obtain new improved cultivars. The objective of this work was to perform the agronomic and molecular characterizations of 35 BC₂F₈ ILs from the cross *O. glumaepatula* x *O. sativa*, aiming to select high-yielding ILs to be used in rice breeding programs. All 35 ILs were field evaluated in the season 2002/03 in three locations and the 15 best performed ones were evaluated in the season 2003/04 in five locations. In 2003/04 six ILs (CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi 9935, CNAi 9936 and CNAi 9937) showed the highest yield means and were statistically superior to the controls Metica 1 and IRGA 417. Molecular characterization of the 35 ILs was performed with 92 microsatellite markers distributed on the 12 rice chromosomes and a simple regression QTL analysis was performed using the phenotypic data from 2002/03. The six high-yielding ILs showed a low proportion of wild fragment introgressions. A total of 14 molecular markers were associated to QTLs in the three locations. The six high-yielding ILs were incorporated in Embrapa's breeding program and the line CNAi 9930 is recommended for cultivation due to additional advantages of good grain cooking and milling qualities and high yield stability. The *O. glumaepatula*-derived ILs proved to be a source of new alleles to the development of high-yielding rice cultivars.

5.1 INTRODUCTION

Modern rice varieties (*Oryza sativa*) are the result of an extensive artificial selection process that led to an extreme pressure over a few target characteristics for rice cultivation, such as non-shattering of seeds, compact growth habit and loss of germination inhibition (Tanksley and McCouch, 1997). This strongly directional selection reduced the genetic variability of cultivated rice due to a great loss of allelic variability in detriment to the fixation of some alleles, which resulted in a phenomenon named “genetic erosion” (Gowda et al., 2003). In addition, rice breeding programs tend to favor methods that maximize endogamy in cultivar development, which drastically reduces new recombination opportunities (Rangel and Neves, 1997). Besides, breeders usually use the same adapted genitors repeatedly in initial breeding crosses (Moncada et al., 2001). These events led to a concerning restriction of selection gains obtained by breeding programs over the past years. One of the objectives of modern breeding has been the recovery of lost diversity through the search of potentially favorable alleles in wild ancestors of rice (Gur and Zamir, 2004).

The AB-QTL (Advanced Backcross QTL) analysis (Tanksley and Nelson, 1996) is a powerful strategy to exploit and use the potential of wild alleles in breeding programs. This methodology integrates the QTL analysis and the introgression of alleles from wild germplasm into elite material under the assumption that marker regions positively associated to traits of agronomic interest can be identified and transferred into elite cultivars (Bernacchi et al., 1998; Frary et al., 2004). The AB-QTL analysis comprises a set of activities that include the development of a backcross population derived from an inter-specific cross followed by its molecular and phenotypic characterization for QTL analysis. Marker loci associated to favorable wild alleles can be used to select genotypes containing these specific genomic regions. After a few selfing generations introgression lines (ILs) are obtained and can be field tested and used for variety development (Frary et al., 2004). Since they contain small wild fragments evenly distributed throughout the elite recurrent genome, ILs can be used for genetic and functional genomics studies, such as the dissection of gene functions and map-based cloning of QTLs underlying quantitative and qualitative traits (Li et al., 2005; Tian et al., 2006b). In addition, ILs are an important reservoir of alleles that can be used in breeding programs to the development of new cultivars with higher genetic diversity and more resistant to biotic and abiotic stresses.

Species related to the cultivated *Oryza sativa* have been used as an additional source of genetic variability in breeding programs, such as *Oryza glumaepatula* (Brondani et al., 2001), *Oryza*

rufipogon (Moncada et al., 2001, Nguyen et al., 2003, Septiningsih et al., 2003) and *Oryza glaberrima* (Aluko et al., 2004). These studies used the AB-QTL methodology to monitor the effects of wild introgressions on important agronomic traits such as grain yield, aluminum tolerance and grain quality. *O. glumaepatula* is a diploid AA species that is autogamous and has an annual life cycle (Vaughan et al., 2003). Populations of *O. glumaepatula* were identified in three Brazilian Biomes (Amazon, Pantanal and Cerrados) and their adaptation to tropical soil and weather increase their chance as donors of genes related to traits of economic importance to rice (Brondani et al., 2005).

The efficiency of using best performed ILs in breeding programs depends on a complete phenotypic and molecular characterization. Phenotypic characterization, which has being a routine in breeding programs, provides a great amount of information about ILs field performance, helping breeders to choose those with desirable traits. Molecular characterization can be used as a complement to field evaluation, providing information about the position and estimated size of introgressed fragments on each IL. The objective of this work was to perform agronomical and molecular characterizations of ILs derived from an *O. glumaepatula* (RS-16) x *O. sativa* (BG 90-2) inter-specific cross (Brondani et al., 2002). These lines were developed at Embrapa Rice and Beans (Goiânia, Goiás, Brazil) over the past ten years, following the AB-QTL strategy (Brondani et al., 2001; Brondani et al, 2002; Rangel et al, 2005).

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Development of the introgression lines (ILs)

ILs were developed from an inter-specific cross between the inbred line BG90-2 (*Oryza sativa*), the recurrent parent, and the wild accession RS-16 (*Oryza glumaepatula*), the donor parent, collected on the Brazilian Amazon Biome. Thirty-five BC₂F₈ lines were obtained using the AB-QTL methodology, as described by Rangel et al. (2005). These lines were selected from BC₂F₂ families and field evaluated on the occasion of a QTL analysis (Brondani et al, 2002). These families were then advanced on subsequent generations using the bulk methodology, where a sample of seeds from each family was mixed and sown together to originate the next generation.

5.2.2 Phenotypical evaluations

The 35 ILs were characterized for grain yield and grain quality traits (amylose content, gelatinization temperature and cohesiveness) in three locations (Goianira - State of Goiás; Formoso do Araguaia – State of Tocantins, and Boa Vista - State of Roraima), as described in Rangel et al. (2005). The joint analysis of variance of these experiments was used to select the 15 best performed ILs, that were evaluated, under irrigated conditions, in five locations (Goianira; Formoso do Araguaia; Boa Vista; Itajai – State of Santa Catarina, and Alegrete – State of Rio Grande do Sul), following a complete randomized block design with four replications and using four high yielding lines as controls (BG 90-2, BRS Formoso, Metica 1 e IRGA 417). Seeds from the 15 lines were sown in three 3m rows spaced at 0.35cm. The lines were evaluated for total yield, measured as the weight of grains from 10 random plants in each family. The analysis of variance was performed for each environment individually and for the five environments together (joint analysis) using the software Genes (Cruz, 1997). ILs trait means were compared by the Scott and Knott test ($p < 0.05$), also performed by Genes software.

5.2.3 Molecular markers assay

Fresh leaves of 10 representative plants of each one of the 35 ILs were collected and the DNA was extracted in bulk of plants, according to the protocol described by Ferreira and Grattapaglia (1998). Microsatellite (SSR – Simple Sequence Repeats) markers used in the molecular characterization were selected based on their distribution throughout the 12 rice chromosomes according to the *Oryza glumaepatula* X *Oryza sativa* linkage maps (Brondani et al., 2001; Rangel et al., 2005) and the Cornell *O. sativa* ssp. *Indica* (IR64) X *O. sativa* ssp. *Japonica* (Azucena) SSR reference map (Temnykh et al., 2001; Cheng et al., 2001; Temnykh et al., 2000; Singh et al., 1996) available at the Gramene web site (<http://www.gramene.org>). A total of 92 polymorphic microsatellite markers were selected, from which 69 were fluorescent-labeled with either hexachloro-6-carboxifluorescein (HEX) or 6-carboxifluorescein (FAM), and the other 23 markers were not labeled (Supplemental Table I). The amplification reactions were carried out in a final volume of 15 μ l containing 15ng of total genomic DNA, 0.3 μ M of each primer, 0.25mM of each dNTP, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl,

1,5mM MgCl₂, 0.2mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) and 1.0 unit of Taq DNA polymerase. The amplification reactions were conducted on a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) with a pre-cycle of 94°C for 5 minutes; followed by 40 cycles of 94°C for 1 minute, 1 minute at the annealing temperature of each primer and 72°C for 1 minute. An extension step of 72°C for 7 minutes was used. Electrophoreses were conducted on an ABI 3100 automated DNA analyzer (Applied Biosystems) and alleles sizing was performed using the software GeneMapper 2.5 (Applied Biosystems). PCR products derived from the non-labeled markers were visualized on 6% denaturing polyacrylamide gels stained with silver nitrate, as described by Bassam et al. (1991). The software CSSL Finder (<http://www.mapdisto.free.fr/CSSLFinder.htm>) was used to estimate the proportion of the parents' genome in each line and to construct the graphical genotypes.

A QTL analysis was performed, as a complementary analysis, to identify which alleles were responsible for effects on yield in the ILs. The analysis was conducted using the genotypic data from the 35 ILs obtained in this work and the phenotypic data obtained in field experiments conducted in Goianira, Boa Vista and Formoso do Araguaia, as described in Rangel et al. (2005). The QTL analysis was performed by the software QGene version 2.30 for Macintosh (Nelson, 1997) using the single-marker regression method.

5.3 RESULTS

5.3.1 Phenotypic evaluation of ILs

In the season 2002/03 the 35 ILs were evaluated in three field experiments for yield-related traits such as grain yield, tiller number and panicle number, and had their grains evaluated for milling and cooking quality traits (Rangel et al.; 2005). In the average of the three locations the most productive lines were CNAi 9930, CNAi 9931, CNAi 9934, CNAi 9935, CNAi 9936 and CNAi 9937. From them only CNAi 9930 showed long, thin and loose grains after cooking, characteristics of commercial value in Brazil and most part of Latin America, and that were not present in the genitor BG90-2. The 15 best performed ILs were selected for further evaluation in five locations in the season 2003/04.

Coefficients of variation of the experiments conducted in the season 2003/04 ranged from 7% (Itajai) to 14% (Alegrete) and were under the expected range for this kind of experiment. According to

the joint analysis of variance obtained for the five locations, lines CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi 9935, CNAi 9936 and CNAi 9937 showed the highest yield average and were statistically superior to the controls Metica 1 and IRGA 417 (Table 1). In the experiment conducted in Itajai, lines CNAi 9931 and CNAi 9930 showed yield results that were statistically superior to the parent BG90-2. All lines, except CNAi 9934-85, CNAi 9924-92 and CNAi 9924-3, were statistically superior to the controls Metica 1 and IRGA 417. In Alegrete and Boa Vista lines CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi 9935, CNAi 9936 and CNAi 9937 showed yield averages that were statistically superior to the controls IRGA 417 and BRS Formoso, which are one of the most productive and extensively planted cultivars on each location, respectively (Table 1).

5.3.2 Molecular characterization of ILs

The 35 ILs were genotyped with 92 microsatellite markers distributed through the 12 rice chromosomes, with an average of 7 markers on each chromosome (Figure 1). A total of 30 wild alleles were detected among the 35 ILs on all chromosomes. The highest number of wild alleles was detected on chromosome 8 (10 alleles) and no homozygous wild allele was detected on chromosomes 5, 6, and 7. The average introgression proportion of homozygous wild alleles was 1.12% and ranged from 1.09% to 3.26%. Heterogeneous fragments ranged from 21.74% (line CNAi 9920-78) to 2.17% (lines CNAi 9930 and CNAi 9932), with an average of 8.18%.

Lines CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi 9935, CNAi 9936 and CNAi 9937 showed the best yield performance in the joint analysis of experiments and showed heterogeneous introgression proportions of 3.26%, 2.17%, 4.35%, 5.43%, 5.43% and 6.52%, respectively. Homozygous wild introgression proportions were 1.09%, 1.09%, 2.17% and 1.09% (Table 1).

In an attempt to identify wild alleles related to high-yielding, a single regression QTL analysis was performed using the molecular data obtained in the present work and phenotypic data for the 35 ILs obtained by Rangel et al (2005). The analysis was performed using phenotypic data for grain yield measured in three locations: Goianira, Boa Vista and Formoso do Araguaia. In Goianira six markers were associated to grain yield ($p < 0.01$) and explained from 21.58% (RM30) to 36.69% (RM1 and 5335) of the phenotypic variation of the trait. In Boa Vista, six markers were identified and the phenotypic variation explained by each one ranged from 15.34% (RM264) to 28.32% (OG10). Two markers were associated to grain yield in Formoso do Araguaia and explained 21.59% (OG10) and 17.58% (RM310) of the phenotypic

variation. In all QTLs the alleles from BG90-2 were responsible for the positive effects on the trait, except the allele from marker RM310, identified in Formoso do Araguaia (Table 2).

QTLs detected in this work were compared to the ones detected for the BC₂F₂ population (Brondani et al., 2002) that derived the 35 ILs (BC₂F₈). This analysis revealed that marker RM1 (chromosome 1) was associated to grain yield measured in Goianira for BC₂F₂ (PV%= 39.11) and for BC₂F₈ (PV%= 36.68). In both analyses, the allele that was responsible for the positive effect came from the cultivated genitor BG90-2.

5.4 DISCUSSION

The agronomic and molecular characterizations of 35 ILs derived from the inter-specific cross *O. glumaepatula* x *O. sativa* revealed that CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi 9935, CNAi 9936 and CNAi 9937 were the most productive lines and that CNAi 9931 and CNAi 9930 were statistically superior to the parent BG90-2 in the trial conducted in Itajai. These lines showed heterogeneous introgressions proportions ranging from 2.17% to 6.42% and homozygous wild introgressions ranging from 1.09% to 2.17%. In fact, most of the wild introgressions were represented by heterogeneous fragments with an average proportion of 8.18% against 1.12% of homozygous introgressions. Since the lines were advanced in bulk in each selfing generation and the DNA was extracted in bulk of 10 plants, the presence of heterogeneous loci was expected, due to the possibility of occurrence, on each locus, of a mixture of heterozygous plants and/or homozygous plants for alleles from *O. glumaepatula* and *O. sativa*.

Lines with higher grain yield showed low introgression proportions. One of the main reasons may be the lower linkage drag in these lines, reducing the possibility of the presence of wild alleles with deleterious effects in genes related to traits of agronomic importance. Tian et al. (2006a) developed ILs containing introgressions from the wild *Oryza rufipogon* and also observed that the high-yielding ILs had the lowest number of introgressed fragments. The backcrosses performed as part of the AB-QTL methodology played an important role in reducing the linkage drag because they allowed a progressive breakage of wild fragments in each cross and the recovery of the cultivated genetic background. The results observed for the high-yielding lines CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi

9935, CNAi 9936 and CNAi 9937 showed that the methodology was efficient in introducing favorable wild alleles while maintaining the best features of BG90-2.

The QTL analysis performed for the 35 ILs showed that markers were associated to grain yield in the three sites of evaluation. The comparison of QTLs detected in the ILs (BC₂F₈) and in the BC₂F₂ families in Goianira revealed that marker RM1 was associated, on both generations, to grain yield. The proportions of phenotypic variation explained by this marker was high in BC₂F₂ and BC₂F₈ generations (39.11 and 36.68, respectively), indicating that this marker was strongly associated to rice grain yield. The genomic region in the vicinity of RM1 locus could be targeted to QTL fine mapping, in order to discover the gene responsible for the favorable expression of the trait. Since this marker was never identified in a QTL analysis involving intra-specific crosses, it can be implied that there are genomic regions from *Oryza glumaepatula* that could act positively with BG 90-2 alleles to increase yield. There is also an opportunity to search for wild genomic fragments that could be involved as a *trans-acting* element to increase the effect of BG 90-2 allele at RM1 locus.

Agronomic and molecular characterizations of the ILs allowed a better knowledge of their genomic composition and performance in the field. This strategy is being used routinely in the development of lines and cultivars originated from broad crosses in rice, mainly those involving inter-specific crosses with *Oryza glumaepatula*, which is today an important source of genetic variability to the breeding program at Embrapa for traits such as yield and drought tolerance. A considerable number of rice ILs have been developed in recent years (Wan et al., 2004; Ebitani et al., 2005; Tian et al., 2006; Wang et al., 2007). The power of QTL detection is higher in ILs than in primary mapping populations such as F₂ or RILs, because, in ILs, it is possible to compare phenotypic effects between alleles on the substituted segments (Ebitani et al., 2005). Therefore, this type of population could be used to detect and confirm QTLs for important agronomic traits. Wan et al. (2004) used 66 ILs and detected six QTLs for grain quality traits that behaved as non-environment-specific and that, according to the authors, could be used for marker-assisted selection. The molecular characterization of the 35 *O. glumaepatula*-derived ILs will allow a rapid identification of wild fragments facilitating the selection of ILs containing homozygous introgressions in regions of interest. Molecular markers allow the identification of introgressed fragments to the early selection of plants with smaller fragments, contributing to a faster and less expensive process. In addition, the effect of small fragments incorporation on the traits of interest can be measured and the favorable alleles, either from the cultivated or the wild parent, can be detected.

Lines CNAi 9934, CNAi 9931, CNAi 9930, CNAi 9935, CNAi 9936 e CNAi 9937 showed high yield performance in five replicated experiments. These high-yielding lines have different fragments of *O. glumaepatula*, combined in different individuals, which confer genetic variability that is useful for low input agriculture. From them, CNAi 9930 is ready to be released to small farmers, due to grain quality traits and high production in ratooning, which increases the total yield in 30% (Rangel et al., 2005). This line has the highest potential for use in breeding programs as a new source of variation for cultivar development because of its high vigor and good grain quality. The best performed ILs are available for rice breeders as a source of new allelic variation to the development of high-yielding cultivars. The generation of new ILs derived from *O. glumaepatula* x *O. sativa* crosses are under way, to continuously offer genetic materials of broaden genetic basis for rice breeding programs.

Table 1. Grain yield (kg/ha) obtained in the trails conducted in the season 2003/04 in five locations: Goianira, State of Goias, Itajai, State of Santa Catarina, Formoso do Araguaia, State of Tocantins, Alegrete,, State of Rio Grande do Sul and Boa Vista, State of Roraima, Brazil. The number of wild fragments and proportions of homozygous and heterogeneous fragments in the high yielding introgression lines are shown.

LINES	Proportion of homozygous fragments	Proportion of heterogeneous fragments	TOTAL MEAN*	Goianira	Itajai	Formoso do Araguaia	Alegrete	Boa Vista
CNAi 9934	1.09	3.26	8946 a	7000 a	7772 b	7548 a	12131 a	10277 a
CNAi 9931	1.09	2.17	8882 a	6836 a	8586 a	6747 a	11722 a	10517 a
BG 90-2	-	-	8598 a	7941 a	7750 b	6380 a	10357 a	10561 a
CNAi 9930	-	4.35	8574 a	7586 a	8295 a	6371 a	10973 a	9644 a
CNAi 9935	-	5.43	8554 a	7278 a	7817 b	6919 a	10247 a	10511 a
BRS Formoso	-	-	8479 a	7495 a	8747 a	7867 a	9755 a	8533 b
CNAi 9936	2.17	5.43	8438 a	7383 a	7847 b	7077 a	10003 a	9879 a
CNAi 9937	1.09	6.52	8390 a	6461 b	7921 b	6558 a	9949 a	11064 a
CNAi 9924-117	-	14.43	7742 b	6464 b	7643 b	5359 b	10389 a	8856 b
CNAi 9933	-	7.61	7577 b	7109 a	7528 b	5820 b	8308 b	9121 b
CNAi 9920-82	2.17	9.78	7394 b	6020 b	6787 c	5523 b	9774 a	8869 b
CNAi 9932	-	2.17	7344 b	5556 b	6899 c	5820 b	9397 a	9048 b
CNAi 9924-105	2.17	10.87	7317 b	7158 a	6300 c	5165 b	9489 a	8475 b
CNAi 9920-88	1.09	4.85	6961 c	5625 b	6640 c	5751 b	8349 b	8442 b
CNAi 9924-85	-	4.35	6957 c	7352 a	5726 d	4580 c	8901 b	8225 b
CNAi 9924-92	2.17	5.43	6916 c	6158 b	5349 d	5017 b	9714 a	8343 b
Metica 1	-	-	6877 c	6714 a	5244 d	5855 b	6742 b	9829 a
IRGA 417	-	-	6872 c	5006 b	5125 d	6998 a	8170 b	9061 b
CNAi 9924-3	3.26	9.78	6287 c	6069 b	5925 d	3973 c	8124 b	7343 b
Mean			7750	6752	7146	6070	9667	9290
CV%			11	11	7	12	14	8

*Total mean was obtained by the analysis of variance of the five locations together (joint analysis).

Table 2. QTLs detected for trait grain yield in 35 RC₂F₈ rice introgression lines with wild genomic fragments. QTLs were detected under the minimum threshold of $p < 0.05$ in three locations: Goianira (State of Goias), Boa Vista (State of Roraima) and Formoso do Araguaia (State of Tocantins), Brazil. PV is the phenotypic variation explained by each marker.

Location	Marker	Chromosome	Source	PV(%)	p
Goianira					
	RM1	1	BG90-2	36.68	0.0001
	5335	11	BG90-2	36.68	0.0001
	RM248	7	BG90-2	30.90	0.0005
	RM220	1	BG90-2	30.43	0.0019
	RM103	6	BG90-2	23.42	0.0043
	RM30	6	BG90-2	21.58	0.0085
Boa Vista					
	OG10	9	BG90-2	28.32	0.0017
	RM178	5	BG90-2	23.41	0.0067
	OG44	3	BG90-2	17.46	0.0125
	RM210	8	BG90-2	16.43	0.0157
	RM267	5	BG90-2	18.01	0.0173
	RM264	8	BG90-2	15.34	0.022
F. do Araguaia					
	OG10	9	BG90-2	21.59	0.0074
	RM310	8	RS-16	17.58	0.0122

Supplemental Table 1. Microsatellite markers used for the molecular characterization of the 35 Introgression Lines. Markers fluorescence labels are Fam (6-carboxyfluorescein) and Hex (hexachloro-6-carboxyfluorescein).

Marker	Chromosome	Position	Forward sequence	Reverse sequence	Annealing temperature (°C)	Fluorescence	Reference
RM1	1	5.5	gcgaaaacacaatgcaaaaa	gcgttggttgacctgac	56	Fam	www.gramene.org
RM220	1	12.2	ggaaggaactgtttccaac	gaaatgcttcccacatgtct	56	Fam	www.gramene.org
RM243	1	76.1	gatctgcagactgcagttgc	agctgcaacgatgtgtcc	56	Fam	www.gramene.org
OG29	1	101.8	gaccagttcacatgcag	gagtgaggcagcaagaca	56	Fam	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM5	1	132.6	tgcaacttctagctgtcga	gcatccgatcttgatggg	56	Fam	www.gramene.org
RM14	1	194.1	ccgaggagaggagttcgac	gtgccaatttctcgaaaa	56	Hex	www.gramene.org
4712	1	219.0	acaggctcgtgaatggta	ctcatcttgccttcttg	48	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
EST12	1	261.6	ccgctcgagaaatgtgct	gctgtgccaattaccgagc	48	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM53	2	42.5	acgtctcgacgatcaatgg	cacaagaacttctcggtag	56	Fam	www.gramene.org
RM341	2	82.7	caagaaacctcaatccgagc	ctctcccgatccaatc	56	Hex	www.gramene.org
OG17	2	88.0	catgcatcaacaacgatc	gtgctcaagttagctgctc	56	Fam	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM263	2	137.3	cccaggctagctcatgaacc	gctacgtttgagctaccag	56	Hex	www.gramene.org
RM240	2	175.8	ccttaatggtagtgtgcac	tgtaaccattccttccatcc	56	Hex	www.gramene.org
RM266	2	192.2	tagtttaaccaagactctc	ggttgaaccctaatctgca	56	Fam	www.gramene.org
RM207	2	202.0	ccattcgtgagaagatctga	cacctcatcctcgtaacgcc	56	Fam	www.gramene.org
RM22	3	46.6	ggtttgggagccataatct	ctgggcttcttactcgtc	56	Hex	www.gramene.org
RM231	3	57.0	ccagattatttctgaggtc	cacttgcatagttctgcattg	56	Fam	www.gramene.org
OG99	3	79.3	gtggaagcacaagaacaaga	tcgtcatgcttcagcact	56	Fam	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM7	3	103.2	ttcgcctgaagtctctcg	cctccatcatttctgttgtt	56	Fam	www.gramene.org
OG44	3	208.0	acaccagctcagctcatc	tgtccaggtagtagcaagctc	56	Hex	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM335	4	0.2	gtacacaccacatcgagaag	gctctatgagatccatgg	56	Fam	www.gramene.org
RM261	4	4.3	ctacttctcccctgtgtcg	tgtaccatcgccaaatctcc	56	Fam	www.gramene.org
OG60	4	28.7	acagctccactcctcacact	attgggtcacattgcagg	56	Hex	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM252	4	45.0	gaatggcaatggcgctag	atgcggttcaagattcgatc	56	Fam	www.gramene.org
RM255	4	70.4	tggtgcgtgtggagatgtg	cgaaaccgctcagttcaac	56	Hex	www.gramene.org
OS15	4	75.0			56	-	Akagi et al., 1996. Theor Appl Genet, 93:1071-1077

Marker	Chromosome	Position	Forward sequence	Reverse sequence	Annealing temperature (°C)	Fluorescence	Reference
RM119	4	76.1	catcccctgctgctgctg	cgccgatgtgtggactagcg	56	Hex	www.gramene.org
4950	4	106.3	cggaagaaggccatcgaggt	tgctcgtgggtgggtgtg	52	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM317	4	118.3	catactaccagttcaccgcc	ctggagagtgtcagtagttga	56	Hex	www.gramene.org
4797	4	130.4	ggagaaggcaatgcaacacg	gccattgccccaagtacta	52	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
4879	4	136.9	cagagatcgattggtagc	ccttgactcagctccat	52	Hex	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM280	4	152.3	acacgatccactttgcgc	tgtgtcttgagcagccagg	56	Hex	www.gramene.org
EST20	4	177.0	gtacgactattgcgccga	ttcacatccattctttaaact	48	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM13	5	15.4	tccaacatggcaagagagag	ggtggcattcgattccag	56	Hex	www.gramene.org
RM267	5	28.6	tgagacatagagaaggaagtg	agcaacagcacaactgatg	56	Hex	www.gramene.org
RM169	5	57.9	tggctggctccgtggtagctg	tccggtgccgttcatccctcc	56	Fam	www.gramene.org
RM163	5	82.4	atccatgtgcccattatgagga	cgctacctccttactactagt	56	-	www.gramene.org
RM178	5	118.8	tcgctgaaagataagcggcgc	gatcaccgttccctccgctgc	56	Hex	www.gramene.org
OG61	5	123.6	gcatgctgatgactgaagg	gaaacgaacggatggaca	56	Fam	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM334	5	141.8	gttcagtgttcagtccacc	gactttgatctttggtggacg	56	Fam	www.gramene.org
RM190	6	7.4	ctttgtctatctcaagacac	ttgcagatgttcttctgatg	56	Fam	www.gramene.org
RM204	6	16.4	gtgactgacttggatcatagg	gtagccatgctctctgacc	56	Hex	www.gramene.org
OG5	6	39.3	ttcatactttcatagaaaccg	tccaatgtgtcttctctaatag	56	-	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM276	6	40.3	ctcaacgttgacacctgtg	tcctccatcgagcagtatca	56	Hex	www.gramene.org
RM253	6	51.3	tcctcaagagtgcaaaacc	gcattgtcatgtcgaagcc	56	Hex	www.gramene.org
5274	6	101.2	ctcgacctccatggcgaact	attgcagacgctcggagagg	48	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM30	6	125.4	ggttagcatctgcacgg	tcacctcaccacacgacacg	56	Hex	www.gramene.org
RM103	6	143.7	cttcaattcaggccgctggc	cgccacagctgacctgatgc	56	Fam	www.gramene.org
4752	7	0.1	tcctgacctctcaacctgc	gccggagagatgatcgagta	50	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM51	7	1.0	tctcgattcaatgtctctcg	ctacgtcatcatcttctccc	56	Fam	www.gramene.org
RM11	7	33.7	tctcctctccccgatc	atagcgggcgaggcttag	56	Fam	www.gramene.org
RM336	7	61.0	cttacagagaacggcatcg	gctggtttgtttcaggttcg	56	Hex	www.gramene.org
RM70	7	64.6	gtggacttcattcaactcg	gatgtataagatagttccc	56	Fam	www.gramene.org
RM234	7	104.8	acagatccaaggccctgg	cacgtgagacaaagacggag	56	Hex	www.gramene.org

Marker	Chromosome	Position	Forward sequence	Reverse sequence	Annealing temperature (°C)	Fluorescence	Reference
RM248	7	126.5	tccttgtaaatctggtccc	gtagcctagcatggtgcatg	56	Hex	www.gramene.org
OS30	8	0.1			56	-	Akagi et al., 1996. Theor App. Genet, 93:1071-1077
RM38	8	33.1	acgagctctcgcacgacct	tcggtctccatgtcccac	56	Hex	www.gramene.org
RM310	8	57.0	ccaaaacatttaaaatcatg	gcttgggtcattaccattc	56	Hex	www.gramene.org
OG85	8	63.9	ctttctgtaatagggg	agactcacgagaacagat	50	-	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM223	8	77.1	gagtgagcttgggctgaaac	gaaggcaagtctggcactg	56	Hex	www.gramene.org
RM210	8	86.9	tcacattcggtggcattg	cgaggatggtgttctactg	56	Fam	www.gramene.org
RM264	8	128.6	gttgcgtcctactgctacttc	gatccgtgctgatgattagc	56	Fam	www.gramene.org
OG10	9	1.1	tggtgaatacaatctaccaat	tgattttattttgtgctaaag	52	Hex	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
OG74	9	37.3	ttgcatcacttagccacagtc	gcgtaaatgcccggagg	56	-	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
OG106	9	43.8	ggcctgtcaccatcttctcta	gggatctgacatggcatatga	56	Fam	Brondani et al., 2001. Hereditas, 134:59-71.
RM257	9	70.9	cagttccgagcaagagtactc	ggatcggagctggcatatg	56	Fam	www.gramene.org
RM278	9	77.5	gtagtgcctcaacaataatc	tcaactcagcatctctgtcc	56	Hex	www.gramene.org
RM245	9	96.0	atgccgagcagtaaatgc	ctgagaatccaattatctgggg	56	-	www.gramene.org
RM201	9	111.2	ctcgtttattacctacagtacc	ctacctctttctagaccgata	56	-	www.gramene.org
RM205	9	114.7	ctggttctgtatgggagcag	ctggcccttcagtttcagtg	56	Hex	www.gramene.org
RM171	10	0.1	aacgaggacacgtacttac	acgagatacgtacgcctttg	56	Fam	www.gramene.org
RM222	10	11.3	cttaaatgggccaatgacg	caaagcttcggccaaaag	56	Fam	www.gramene.org
RM216	10	17.6	gcatggccgatgtaaaag	tgtataaaaccacacggcca	56	Hex	www.gramene.org
RM311	10	25.2	tggtagtataggtactaaacat	tcctatacacatacaacatac	56	Hex	www.gramene.org
RM304	10	73.0	tcaaacggcacatataagac	gataggagctgaaggagatg	56	Hex	www.gramene.org
RM484	10	79.0	tctccctctcaccattgtc	tgctgccctctctctctc	56	Hex	www.gramene.org
RM333	10	91.7	gtacgactacgagtgtaccaa	gtcttcgcatcactcgc	56	Hex	www.gramene.org
RM20	11	0.1	atctgtccctgcaggtcat	gaaacagaggcacatttcattg	56	-	www.gramene.org
RM4	11	1.0	ttgacgaggtcagcactgac	aggggtgatccgactcatcg	56	-	www.gramene.org
5335	11	2.0	ttacggcagctaggcaagag	gtcagtgtagcacaaggaa	52	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM167	11	20.4	gatccagctgaggaacacgt	agtccgaccacaaggtgcgtgtc	56	-	www.gramene.org

Marker	Chromosome	Position	Forward sequence	Reverse sequence	Annealing temperature (°C)	Fluorescence	Reference
RM2	11	23.9	acgtgtcaccgcttctc	atgtccgggatctcatcg	56	-	www.gramene.org
RM332	11	27.9	gcgaaggcgaaggtgaag	catgagtgatctcactcacc	56	Hex	www.gramene.org
RM202	11	34.8	cagattggagatgaagtctcc	ccagcaagcatgtcaatgta	56	-	www.gramene.org
RM229	11	51.1	cactcacacgaacgactgac	cgcaggttcttgtaaagt	56	Hex	www.gramene.org
RM224	11	83.4	atcgatcgatcttcacgagg	tgctataaaaggcattcggg	56	Hex	www.gramene.org
RM206	11	102.9	cccatgcgtttaactattct	cgttccatcgatccgatgg	56	Fam	www.gramene.org
RM117	12	0.2	cgatccattcctgctgctcgcg	cgccccatgcatgagaagacg	56	Fam	www.gramene.org
4653	12	32.3	ctcggacaagcatgatct	aaccgatgcagatcagag	52	Fam	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM277	12	57.2	cggtcaaatcatcacctgac	caaggcttgaaggaag	56	Fam	www.gramene.org
5411	12	102.0	ggtattgtcgggttcagg	gtgaaggctgtaccatcca	52	-	Rangel et al., 2007. GMB, 30:614-622.
RM17	12	105.3	tgccctgtattttctctc	ggtgatccttcccattca	56	-	www.gramene.org

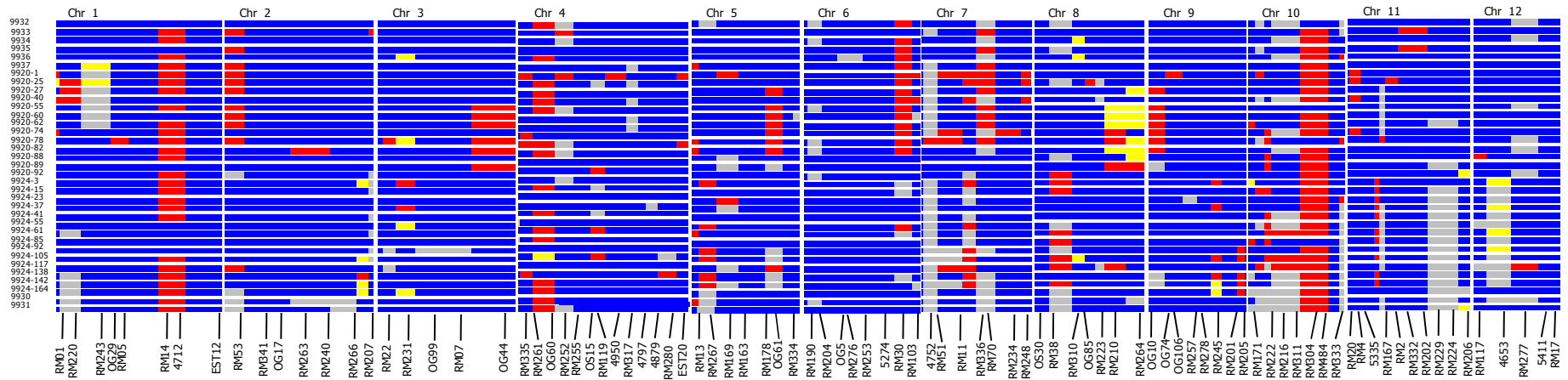


Figure 1. Graphical genotypes of the 35 introgression lines showing the 12 rice chromosomes. Blue squares represent the recurrent parent (*Oryza sativa*) proportion of the genome. Yellow squares represent the wild (*Oryza glumaepatula*) homozygous introgressions, red squares are the heterogeneous introgressions and gray squares represent missing data. SSR markers distributions on each chromosome are shown.

5.5 BIBLIOGRAPHY

- Aluko G, Martinez C, Tohme J, Castano C, Bergman C, Oard HJ (2004) QTL mapping of grain quality traits from the inter-specific cross *Oryza sativa* x *O. glaberrima*. *Theor Appl Genet* 109:630–639.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 196:80-83.
- Brondani C, Brondani RPV, Rangel, PHN, Ferreira, ME (2001) Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the inter-specific cross *Oryza glumaepatula* X *Oryza sativa*. *Hereditas* 134:59-71.
- Brondani C, Brondani RPV, Rangel PHN, Ferreira ME (2002) QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theor Appl Genet.* 104:1192-1203.
- Brondani RPV, Zucchi MI, Brondani C, Rangel PHN, Borba TCO, Rangel PN, Magalhães MR, Vencovsky R (2005) Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica* 125:115-123.
- Cheng Z, Presting GG, Buell R, Wing RA, Jiang J (2001) High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157:1749-1757.
- Cruz, CD (1997) Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. UFV, Viçosa, 442 pp.
- Ebitani T, Takeuchi Y, Nonoue Y, Yamamoto T, Takeuchi K, Yano M (2005) Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of *indica* rice cultivar Kasalath in a genetic background of *japonica* elite cultivar Kohihikari. *Breeding Science.* 55:65-73.
- Frary A, Fulton, TM, Zamir D, Tanksley SD (2004) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* x *L pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae *Theor Appl Genet* 108:485-496.
- Gowda M, Venu RC, Roopalakshmi K, Sreerekha MV, Kulkarni RS (2003) Advances in rice breeding, genetics and genomics. *Mol Breed* 11:337-352.
- Gur A, Zamir D (2004) Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLOS Biol* 2:1610-1615.

- Li J, Xiao J, Grandillo S, Jiang L, Wan Y, Deng Q, Yuan L, McCouch SR (2004) QTL detection for rice grain quality traits using an inter-specific backcross population derived from cultivated Asian (*Oryza sativa* L) and African (*O glaberrima* S) rice. *Genome* 47:697-704
- Nelson, JC (1997) QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Mol Breed* 3:239-245.
- Moncada P, Martínez CP, Borrero J, Chatel M, Gauch Jr H, Guimarães E, Tohme J, McCouch SR (2001) Quantitative trait loci for yield components in an *Oryza sativa* X *Oryza rufipogon* BC₂F₂ population evaluated in an upland environment *Theor Appl Genet* 102:41-52.
- Nguyen BD, Brar DS, Bui BC, Nguyen TV, Pham LN, Nguyen HT (2003) Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 106:583-593, 2003.
- Rangel PHN, Brondani C, Rangel PN, Brondani RPV, Zimmermann FJP (2005) Development of rice lines with gene introgression from the wild *Oryza glumaepatula* by the AB-QTL methodology. *CBAB* 5:10-21.
- Rangel PHN, Neves PC (1997) Selección recurrente aplicada al arroz de riego en Brasil. In: Guimarães, E. P. Selección recurrente en arroz. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 240 p.
- Rangel PN, Brondani RPV, Coelho ASG, Rangel PHN, Brondani C (2007). Comparative linkage mapping of *Oryza glumaepatula* and *Oryza sativa* inter-specific crosses based on microsatellite and expressed sequence tag markers. *Genet Mol Biol.* 30:614-622.
- Septiningsih EM, Prasetyono J, Lubis E, Tai TH, Tjubaryat T, Moeljopawiro S, McCouch SR (2003). Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. *Theor Appl Genet* 107:1419-1432.
- Singh K, Ishii T, Parco A, Huang N, Brar DS, Khush GS (1996) Centromere mapping and orientation of the molecular linkage map of rice (*Oryza sativa* L). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6163-6168.
- Tanksley SD, Nelson, JC (1996) Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor Appl Genet* 92:191-203.
- Tanksley SD, McCouch, SR (1997) Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277:1063-1066.
- Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho YG, Ishii T, McCouch SR (2000) Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L). *Theor Appl Genet* 100:697-712.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch SR (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L): frequency, length variation, transposon associations and genetic marker potential. *Genome Res* 11:1441-1451.

Tian F, Li DJ, Fu Q, Zhu ZF, Fu YC, Wang XK, Sun CQ (2006a) 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. *Theor Appl Genet* 112:570-580.

Tian F, Zhu Z, Zhang B, Tan L, Fu Y, Wang X, Sun CQ (2006b) Fine mapping of a quantitative trait locus for grain number per panicle from wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Theor Appl Genet* 113:619-629.

Wan XY, Wan JM, Su CC, Wang CM, Shen WB, Li JM, Wang HL, Jiang L, Liu SJ, Chen LM, Yasui H, Yoshimura A (2004) QTL detection for eating quality of cooked rice in a population of chromosome segment substitution lines. *Theor Appl Genet* 110:71-79.

Wang J, Wan X, Li H, Pfeiffer WH, Crouch J, Wan J (2007) Application of identified QTL-marker associations in rice quality improvement through a design-breeding approach. *Theor Appl Genet* 115:87-100.

6 ARTIGO 2

IDENTIFICATION OF QTLS FOR YIELD-RELATED TRAITS AND DROUGHT TOLERANCE IN INTROGRESSION LINES FROM THE CROSS *Oryza sativa* (BRSMG Curinga) X *Oryza glumaepatula* (GEN1233).

ABSTRACT

The development of drought tolerant rice cultivars is an important strategy to increase the production with a more rational use of water resources. The progress on the development of these cultivars can be accelerated by increasing the genetic variability of lines used in breeding programs. Wild relatives of rice have been used as a source of variability and useful alleles to cultivated rice (*Oryza sativa*) and have the potential to be used as donors of alleles to increase the tolerance to biotic and abiotic stresses. The objective of this work was to evaluate the potential of the wild *Oryza glumaepatula* as a source of drought tolerance alleles to an upland rice cultivar from Brazil. A total of 59 BC₁F₁ families from the cross between the wild accession GEN1233 and the upland cultivar BRSMG Curinga were used to construct a linkage map with 157 molecular markers (133 microsatellites and 24 MITE-markers) that covered 1,721.47cM of the rice genome with an average marker distance of 10.9cM. One hundred and forty-two BC₂F₂ families derived from this cross were evaluated in field experiments under two conditions, one fully-irrigated and one under water stress, for yield-related traits. Eight QTLs were detected on both conditions, four on the fully irrigated treatment and four under water stress. In the non-stress treatment, QTLs were detected for traits spikelet fertility (SF), tiller number (TLN), plant height (PLH) and 100 grain weight (100GW) and in the stress treatment QTLs were detected for traits yield (YLD), spikelet fertility (SF), tiller number (TLN) and panicle number (PANN). The wild alleles had positive effects on the traits TLN and 100GW in non-stress and TLN and PANN in stress. Transgressive segregants, showing better performance than the cultivated parent, were identified for traits TLN and PANN in non-stress and GPP, TLN, PANN and 100GW in stress, showing that the wild alleles contributed to yield stability and plant vigour in this population. One family (number 12) was identified as promising to originate introgression lines because it showed high yield stability, keeping high yield means on both treatments, and number of tillers and panicles statistically superior to BRSMG Curinga. These results show that *O. glumaepatula* contributed with alleles that favored yield stability and tillering ability in the inter-specific families, which could contribute to the development of drought tolerant introgression lines that have, at the same time, high plant vigour and are able to efficiently compete with weeds under upland growth conditions. The population evaluated in this work will be used in the development of introgression lines that will be readily available to rice breeding programs.

6.1 INTRODUCTION

Rice (*Oryza sativa* L.) is the main source of calories and proteins for more than half of the population of the world (Maclean et al., 2002). Asian and South American countries are the main growers and together they produced more than 610 million tons of rice in 2006 (FAO, 2006). Developing countries in Asia, South America and Africa are the main consumers and it is estimated that this cereal provides from 50% to 80% of the daily calories to people in these regions (Maclean et al., 2002; FAO, 2005). In the past few years world rice production increased 1.09%, while population grew 1.32% and rice consumption increased 1.27% (Guimarães et al., 2006). The expansion of lands for agriculture is a questionable alternative to supply the increasing demand for rice grains, because there is a major concern on the impact of deforestation on the environment. In addition there is a growing concern on the shortage of water resources, especially if it is considered that irrigated rice can be a potential competitor of water supply for human consumption.

The best alternative to increase rice production is to increase the productivity in the existing arable land through technological innovations, leading to a more rational use of irrigation water (Kijne, 2006). Water demand for rice cultivation varies according to the growing system and can be as high as 2,000 liters for 1kg of rice production in irrigated paddy systems (Embrapa, 2005). Water demand should decrease under aerobic upland cultivation, especially if the rain is well distributed and artificial irrigation is not needed. However, the main constraint in this type of cultivation system is that rice is more sensitive to water deficit when compared to other crops, which can result in drastic yield losses if rain is not regular and/or there is no artificial irrigation available (Lafitte et al., 2004). The development of drought tolerant cultivars is an alternative to increase productivity under water stress and to provide opportunities for rice cultivation under a system that allows a more rational use of irrigation water.

Breeding for drought tolerance is laborious and time consuming because the traits are difficult to measure and a great number of genotypes need to be tested (Manickavelu et al., 2006). Progress in the development of drought tolerant rice varieties have been slow mainly because it is less tolerant than other grasses, which means that the variability in the rice genetic pool might be reduced (Fukai & Cooper, 1995; Liu et al., 2004a). Landraces and wild relatives of rice are an important source of variability to cultivated lines, but their utilization in breeding programs is not a routine because they have undesired traits, such as low yielding, seed shattering and poor plant architecture (Gur & Zamir, 2004). The AB-QTL methodology (Advanced Backcross-

Quantitative Trait Loci), originally proposed by Tanksley & Nelson (1996), have been used to facilitate the use of wild rice species in breeding programs. Brondani et al. (2002), following the AB-QTL methodology, evaluated a BC₂F₂ population from an interspecific cross between an elite rice line (BG90-2) and an *O. glumaepatula* accession (RS-16) under irrigated conditions and mapped QTLs that showed positive allele effects from the wild parent for the traits tiller number and panicle number. This population was field-evaluated in advanced generations and introgression rice lines, containing wild fragments distributed throughout the elite recurrent parent genome, were obtained through field selection in association with marker assisted selection (Rangel et al., 2005). McCouch et al. (2007) reviewed the utilization of the wild *O. rufipogon* as a donor of alleles in several inter-specific crosses that followed the AB-QTL methodology and showed that this methodology was successful in the development of introgression lines that have been used in rice breeding programs as a source of new allelic variation and to isolate genes underlying QTLs.

QTL mapping studies in rice have used microsatellites (also called SSRs – Simple Sequence Repeats), which are markers based on the polymorphism of repeated motifs containing from one to six nucleotides (Weber e May, 1989), mainly because they are widely available, co-dominant (detect both alleles in a locus), highly informative and easily reproducible (McCouch et al., 2002). The availability of the rice complete genome sequence (IRGSP, 2005) opened the possibility for the search of polymorphic sites and the development of molecular markers that can virtually sample every region of the genome. The rice genome sequence have been explored and new classes of molecular markers have been extensively used, the most strong example been the single nucleotide polymorphisms (SNPs) that are abundant and well distributed throughout the rice genome (Rafalski, 2002). There is also the opportunity to explore gene coding regions and other constitutive sequences of the genome. The development of markers based on the polymorphism of transposable elements is an interesting strategy because they are important constituents of the rice genome and play an important role in plants' genome evolution (Grzebelus, 2006). MITEs (Miniature Inverted Transposable Elements) constitute a special class of non-autonomous transposable elements which are small in size (between 100bp and 500bp) and present in a great number of copies in the genome (between 1,000 and 15,000 per haploid genome) (Casa et al., 2000). Hue et al. (2006) used MITE-derived markers to characterize a set of rice lines and cultivars (*O. sativa*) and 28 accessions of the wild *O. rufipogon* and concluded that the two rice subspecies, *indica* and *japonica*, are the result of two distinct evolution events. The authors affirmed that these markers are suitable for evolutionary studies. The availability of a

great number of molecular markers that can sample the rice genome facilitates the use of rice germplasm in wide crosses to bring new allelic variability to breeding programs.

Wild relatives of rice are an important reservoir of alleles and have been used as a source of diversity for various traits in rice (Brar & Kush, 1997; Brondani et al., 2002; McCouch et al., 2007). According to Liu et al. (2004a), despite the fact that most of the wild rice species are adapted to semi-aquatic environments, they can be explored as a source of drought tolerance alleles. These authors evaluated six wild rice species for several traits related to responses to drought and found that they showed good levels of osmotic adjustment and that several accessions survived to long periods of water deficit. *Oryza glumaepatula*, one of the four wild rice species that occur in Brazil, is an autogamous species that has AA genome and is found in Central and South Americas from 23°N in Cuba to 23°S in Brazil (Vaughan et al., 2003). In its natural environment the wild *O. glumaepatula* can be found in flood-prone depressions in the margins of rivers or in flooded depressions, when far from river beds (Brondani et al., 2005). Normally, the seeds germinate during the dry season and the elongation of the internodes rapidly occurs in response to water during the rainy season, when the river floods its margins. Panicle emission begins from three to four months after germination and plants can reach a mean height of three meters (Rubim, 1994). The importance of *O. glumaepatula* resides on the fact that it occurs in a wide range of environments and is adapted to tropical climate and soil conditions (Brondani et al., 2005). It has been used as a source of alleles that improved plant architecture and yield in rice (Brondani et al., 2002; Rangel et al., 2005) and it has a great potential as a donor of alleles for biotic and abiotic stresses due to its occurrence in diverse environments.

The objective of this work was to evaluate the potential of *O. glumaepatula* as a source of alleles at genes related to drought tolerance in rice. A genetic map was constructed with SSRs and MITE-markers and a search for QTLs related to yield-related traits evaluated under water stress was performed. This work was developed as part of an international project, financed by the Generation Challenge Program, which aimed to develop introgression lines containing wild fragments from four rice wild species (*O. barthii*, *O. glumaepatula*, *O. meridionalis* and *O. rufipogon*). The objective was to offer new allelic variability to rice breeding programs all over the world, opening the opportunity to explore the wild alleles for stresses, such as drought and high aluminum concentration in the soil, bringing benefits to least economic favored regions in Africa and South America. The information gathered in this work will bring new insights on the use of the wild *O. glumaepatula* as a source of drought tolerance alleles to new rice cultivars.

6.2 MATERIAL AND METHODS

6.2.1 Experimental population

A backcross population was obtained from an inter-specific cross between the cultivar BRSMG Curinga (*Oryza sativa*) and the wild accession GEN1233 (*Oryza glumaepatula*). BRSMG Curinga is a Brazilian upland cultivar developed at Embrapa Rice and Beans (Goiania, Goias, Brazil), in cooperation with Federal University of Lavras (UFLA – Lavras, Minas Gerais, Brazil) and Ciat (Cali, Colombia), that is well adapted to a wide range of cultivation environments and is more tolerant to water stress than other upland cultivars widely grown in Brazil, such as Primavera and BRS Soberana (Morais et al., 2005). The wild accession GEN1233 was chosen as the donor parent in this cross because it was collected in the Cerrado Biome of Brazil (Uruana, Goias, Brazil - 15° 29' 52" S and 49° 41' 16" W), which is characterized for its acidic soil that contains aluminum and iron in high concentrations, and for having a long dry season, occurring normally from May until September (Paulo H. N. Rangel, personal communication).

The accession GEN1233 was used as the male parent in the inter-specific cross and BRSMG Curinga was the recurrent parent. A total of 20 F₁ plants were obtained and their hybrid nature was tested with five molecular markers. Nineteen F₁ plants that were heterozygous for all markers used in the hybrid test were backcrossed to BRSMG Curinga. Due to the high level of sterility found in this cross, the BC₁F₁ population had 59 individuals that were genotyped to estimate the markers distances in the linkage map. These plants were backcrossed one more time to BRSMG Curinga and the 142 BC₂F₁ plants obtained in this second backcross were genotyped for QTL analysis. For the field trials 142 BC₂F₂ families were evaluated under irrigated and water stress conditions.

6.2.2 Field trial

The field trial was conducted at an experimental station in Porangatu, located at the northern region of Goias State, Brazil (13° 26' 27" S and 49° 8' 56" W). The climate in this region is characterized for two well defined seasons, one wet and one dry. The dry season occurs from May until September and comprehends a period when water precipitation is insignificant. During the wet season the mean precipitation ranges from 1,200mm to 1,500mm. Two adjacent trials were

conducted, during the dry season, under upland cultivation conditions, representing two treatments: one fully irrigated (non-stress) and one with water restriction (water stress). The trials followed the Lattice 12x12 experimental design with three replicates, where each one of the 12 blocks had 12 plots. Seeds for the 142 BC₂F₂ families and two controls, the upland cultivars BRSMG Curinga and BRS Soberana, were sown in one 2m row, sided by two 2m rows of BRSMG Curinga, spaced at 0.35cm, with a density of 50 seeds per meter. The trials were conducted side by side and were submitted to optimal irrigation conditions until the crop was well established (25 to 30 days after emergency). The wild parent GEN1233 was not field-evaluated because its life cycle is long when compared to BRSCuringa's (approximately six months for GEN1233 against four months for BRSMG Curinga), which would make its evaluation impossible.

For the non-stress treatment the trial was sprinkler-irrigated every two days during the entire cultivation period, with applications of approximately 38mm of water. Water potential in the soil was kept at the minimum level of -0.025MPa and was controlled using tensiometers at 15cm depth. For the stress treatment the trial was also irrigated every two days until water stress was initiated 30 days after emergency. During the stress, the trial was sprinkler-irrigated every four days, receiving half of the water volume from the non-stress condition. Plants were submitted to the stress from the beginning of reproductive stage until harvest.

The 142 BC₂F₂ families were evaluated for eight yield-related traits that were measured on both trials. *Days to flowering* (DTF) was recorded as the number of days from sowing until 50% of the plants in a plot had flowering tillers. Total *yield* (YLD) was estimated, in kg ha⁻¹, from the total grain weight of each plot. *Tiller number* (TLN) and *panicle number* (PANN) were obtained from plants in one meter line of each plot. *Plant height* (PLH) was measured as the length, in centimeters, from the ground to the tip of the panicle of the tallest tiller of six plants. *Spikelet fertility* (SF) was estimated as the proportion of filled grains from the total number of filled and unfilled grains counted in 10 panicles per plot. The number of *grains per panicle* (GPP) was estimated from the total number of grains counted in 10 panicles per plot and the *weight of 100 grains* (100GW) was obtained from 100 filled grains counted in the same 10 panicles per plot. The analysis of variance was performed and phenotypic, genotypic and environmental correlations were estimated using the statistical software Genes (Cruz, 2001). Adjusted means obtained from the analysis of variance were compared by the Scott & Knott test (p<0.05) and their frequencies distributions were estimated.

6.2.3 Molecular markers assay

A total of 850 molecular markers were screened for the presence of polymorphism between the parents. From these, 258 were microsatellite markers from the “Rice Ciat SSR 2006” reference map (www.gramene.org/db/cmap/) and 63 were microsatellites selected from the Gramene markers database (<http://www.gramene.org/markers/index.html>) to fill some gaps on regions that were sub-represented by the markers from the reference map. The other 529 markers that were screened were designed to amplify regions of the rice genome that have insertions or deletions of small transposable elements named MITEs (MITE-markers) (Susan McCouch, personal communication).

The amplification reactions were performed in a final volume of 15 μ L containing 15ng of DNA, 0.3 μ M of each primer, 0.25mM of each dNTP, 5% (v/v) dimethyl sulfoxide, 10mM of Tris-HCl (pH 8.3), 50mM of KCl, 1.5mM of MgCl₂ and one unit of Taq DNA polymerase. The amplifications were conducted with a pre-cycle of 94°C for 5 min followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, specific primer annealing temperature (that ranged from 48°C to 56°C) for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 7 min. Microsatellite amplification products were separated by electrophoresis on 5% (w/v) agarose gels stained with ethidium bromide (0.1 μ g/ μ L) or, when more resolution was needed to detect allele differences, 6% (w/v) denaturing acrylamide gels stained with silver nitrate (Bassam et al., 1991) were used. The PCR products derived from the MITE-markers were visualized on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide (0.1 μ g/ μ L).

The χ^2 test was performed, for each marker, to test for deviations of genotypic classes from the expected Mendelian inheritance ratios of 1:1 (50% of homozygous individuals for the BRSMG Curinga allele and 50% of heterozygous individuals for each locus) ($p < 0.05$). The false discovery rate (FDR) was determined for the χ^2 tests from the observed p-value distribution and was used to correct multiple comparisons by controlling the probability of false positives (Benjamin & Hocheberg, 1995). Linkage analysis was performed using the software Mapdisto version 1.7b (<http://mapdisto.free.fr/>). Markers assignment into linkage groups and their orders on each group were established according to their known genomic positions available at Gramene web site (www.gramene.org). Map distances (in cM) were estimated using the command “Extract map from DB” available in MapDisto with parameters LOD>3.0, maximum recombination fraction of 0.40 and Kosambi mapping function.

6.2.4 QTL analysis

QTL analysis was performed using the software Windows QTL Cartographer version 2.5 (Wang et al., 2005). Composite interval mapping was performed with a walk speed of 2cM and a window size of 10cM. The forward-backward regression method was used to identify markers that were associated with traits differences. The significant thresholds for QTL detection were also determined, for each trait, from 1,000 permutations tests at the significance level of $p < 0.05$ (Churchill and Doerge, 1994). The proportion of phenotypic variance (R^2) explained by the QTL, which shows the relative contribution of a particular locus to the trait, and the QTL additive effects were estimated by Windows QTL Cartographer. The markers on the peak of the intervals to which QTLs were associated were used in a search for transcripts using the search tool available at Gramene web site (www.gramene.org). The marker positions were identified, in base pairs, on the “Rice Gramene Annotated Nipponbare Sequence 2006 Map” and the search for annotated transcripts was performed in a region that spanned 100Kbp upstream and 100Kbp downstream the marker region. The transcripts that had hits on the “Genes Ontology” data base were considered and their functions were determined. Graphical genotypes are a variant of a linkage map plot that shows the parental genotypes at every marker locus on a chromosome and give an idea of the approximate genomic composition of a genotype. Graphical genotypes showing the wild introgressions in the BC_2F_1 plants were obtained using the software GGT32 (Van Berloo, 1999). The average proportions of heterozygous introgressions and the genomic proportion of homozygous cultivated genomic fragments were estimated.

6.3 RESULTS

6.3.1 Phenotypic variation and traits correlations

The frequencies distributions of traits were approximately normal, except for DTF that was skewed towards higher values, which means that the families, in general, showed a flowering delay (Figure 1). This was expected, because *Oryza glumaepatula* has a longer cycle and flowering can occur until 120 days after germination. Most families were under the same range of DTF, between 100 and 110 days in non-stress and 100 and 115 days in stress. The statistical summary of the phenotypic performance of the BC_2F_2 families and controls (BRSMG Curinga and BRS

Soberana) are shown in Table 1. Considering the controls, BRSMG Curinga was more tolerant to water stress than BRS Soberana and showed better means for all yield components (GPP, SF, PANN and 100GW) and for TLN. The comparison of families' means with the parental BRSMG Curinga (*O. sativa*) revealed positive transgressive segregants for DTF, TLN and PANN in non-stress and DTF, GPP, TLN, PANN and 100GW in stress that showed means statistically superior BRSMG Curinga ($p < 0.05$). Transgressive segregants are the genotypes in the offspring whose performance exceeds the better parent, in a positive or negative way, and are commonly observed in inter-specific populations (Brondani et al., 2002; McCouch et al., 2007).

Phenotypic and genotypic and environmental correlations of traits measured in non-stress and stress treatments were estimated. Table 2 shows that positive phenotypic and genotypic correlations were found, respectively, between YLD in non-stress and its components, GPP (0.42 and 0.47), SF (0.51 and 0.65) and PANN (0.56 and 0.61), and between YLD and three of its components in stress, SF (0.75 and 0.87), PANN (0.30 and 0.39) and 100GW (0.47 and 0.66). Strong positive phenotypic and genotypic correlations were found between TLN and PANN both in non-stress (0.86 and 0.87) and stress (0.89 and 0.95) and intermediate correlations were found between TLN and YLD in non-stress (0.53 and 0.54) and stress (0.28 and 0.35). Intermediate phenotypic correlation coefficient was found between YLD in non-stress and YLD in stress conditions (0.47), but the genotypic correlation coefficient found between YLD in both conditions was high (0.77).

6.3.2 Linkage map construction and QTL mapping

From the 850 molecular markers that were screened for the presence of polymorphism between the parents, 157 (18.47%) were polymorphic. From the 258 SSR markers from the "Rice Ciat SSR 2006" reference map, 57 (22.09%) did not amplify under the minimum annealing temperature of 48°C, 35 (13.56%) did not amplify the allele from the wild parent (GEN1233), 65 (25.19%) were not polymorphic between the parents BRSMG Curinga and GEN1233, meaning that 101 (39.15%) were polymorphic. From the 63 markers selected from Gramene database, 14 (22.22%) did not amplify, 17 (26.99%) were not polymorphic and 32 (50.79%) were polymorphic. From the 529 MITE-markers, only 24 (4.54%) showed polymorphism between the parents. According to the χ^2 test corrected by the FDR test, 31 out of 157 polymorphic markers deviated from the expected Mendelian segregation ratios for a BC₁F₁ population. From the deviated

markers, 11 were skewed towards the wild parent (GEN1233) and the other 20 were skewed towards the cultivated parent (BRSMG Curinga).

All 157 polymorphic markers (133 microsatellites and 24 MITE-markers) were used to genotype the BC₁F₁ population and to construct the linkage map (Figure 2). The markers were well distributed along the 12 rice chromosomes, covering 1721.47cM of rice genome, with an average marker distance of 10.9cM. The average number of markers in each chromosome was 13, varying from eight (chromosomes 11 and 12) to 21 (chromosome 1), and chromosomes length varied from 252.28cM (chromosome 3) to 74.96cM (chromosome 9). Some gaps, with adjacent markers distances higher than 30cM, were observed in chromosomes 4, 6 and 10. These gaps remained despite the efforts to insert microsatellite markers and this was due to the fact that all markers that were tested to fill the gaps were not polymorphic.

A QTL analysis was performed to search for associations between the markers intervals on the linkage map and yield-related traits measured under fully irrigated and water stress conditions. Composite interval mapping revealed four QTLs for traits measured in the non-stress treatment and four QTLs for traits measured in the stress treatment (Table 3). In non-stress, QTLs for SF, TLN, PLH and 100GW were identified with determined LOD Scores higher than 3.0. The phenotypic variation explained by each QTL (R^2) ranged from 9.24% (*qPLHn5*) to 27.57% (*qGWn4*) and, except in the QTL detected for SF, the allele contributing with the positive effect on the QTLs were the wild (*O. glumaepatula*) alleles. In the stress treatment QTLs were detected for YLD, SF, TLN and PANN and the LOD Score lower than 3.0 was determined, by 1,000 permutations, for *qTLNs11* (2.94). The phenotypic variation explained by the QTLs varied from 8.0% (*qPANNs11*) to 11.45% (*qSFs11*) the positive effects on these QTLs came from the wild allele.

The QTLs detected for SF in non-stress (*qSFn11*) and stress (*qSFs11*) and for YLD in stress (*qYLDs11*) treatments were located on the same region of chromosome 11 and the QTLs' peaks were associated to the same marker interval (RM26646-RM26999) (Table 3). A search for these markers positions on the "Rice Gramene Annotated Nipponbare Sequence 2006 Map" available at Gramene web site (www.gramene.org) revealed that the QTL interval ranged an interval from 14,908,966bp to 22,097,224bp on chromosome 11. The marker on the peak of this interval was the RM209, located at the position 17,771,755bp and the search for transcripts performed around this marker (100Kbp upstream and 100Kbp downstream) revealed a total of 17 transcripts with known and/or putative functions (Table 4). These transcripts comprised eight transposable elements related proteins, one trans-membrane transporter protein, four transcription factors, one TGF-beta receptor binding protein that acts on cell growth regulation and three protein kinases expressed in response to stress. The QTL detected for TLN in non-stress (*qTLNn12*) was

located on chromosome 12 and spanned the interval RM463 – RM1227 with marker RM1227 on the peak (Table 3). A total of 24 transcripts were found in the search interval around the peak marker, from which three were transposable elements related proteins, one was a trans-membrane transporter protein, five were proteins expressed in response to stress (one trans-membrane transporter protein, one protein binding protein, one protein kinase, one Type I hypersensitivity protein and one peptide transporter protein), one was a transcription factor and 14 were transcripts related to proteins that act on the basal metabolism of the cell, such as enzymes, ATPases and ATP binding proteins (Table 4).

The QTL interval for PLH in non-stress ranged from RM18451 to RM188 with marker RM18451 on the peak (Table 3). The search for transcripts revealed two trans-membrane transporter proteins, two protein binding proteins, two transcription factors, one transposable element related protein and four proteins from the basal metabolism (Table 4). The QTL detected for 100GW in non-stress spanned the marker interval RM119-RM252 and the marker on the peak was RM119 (Table 3). A total of 20 transcripts were found around the peak marker, from which two were protein kinases, two were trans-membrane transporter proteins, one was a transposable element related protein, one was a transcription factor and the other 14 transcripts were related to proteins from carbohydrate and protein metabolisms and from cells basal metabolism. The QTLs detected for TLN and PANN in stress were located on the same region of chromosome 11 spanning the marker interval RM7173-RM26105 (Table 3). The marker on the peak of this interval was RM7173 and the search for transcripts revealed six transposable elements related proteins, two protein kinases, one transcription factor, one transmembrane transporter protein and 11 proteins related to the basal metabolism of the cell.

Graphical genotypes were obtained to show the genomic composition of all 142 BC₂F₁ plants for the chromosomes 4, 5, 11 and 12, which had QTLs with positive effects from the wild allele (Figure 3). On chromosome 4, 10 plants (7.04%) showed heterozygous introgressions in the marker interval of the QTL detected for 100GW in non-stress (RM119-RM252) and, on chromosome 5, on the marker interval were a QTL for PLH in non-stress was detected (RM18451-RM188), 82 (57.75%) plants showed heterozygous introgressions. On chromosome 11, on the intervals RM26646-RM26999, where two QTLs for SF, one in non-stress and one in stress treatments, and one QTL for YLD in stress were detected, 42 (29.57%) plants showed heterozygous introgressions. Also on chromosome 11, in the marker interval RM7173-RM26105, that was associated to the QTLs detected for TLN and PANN in stress, 50 plants (35.21%) had introgressions. On chromosome 12, on the interval RM463-RM1227, where a QTL for TLN in non-stress was detected, 15 (10.56%) plants showed introgressions. Accounting all chromosomes, the

average composition of the BC₂F₁ genome was 78.8% of homozygous fragments from *O. sativa* and 20.1% of heterozygous *O. sativa/O. glumaepatula* introgressions, which is in accordance with the expected proportion for a BC₂ population (75% homozygous:25% heterozygous) (according to the X² test at p<0.05).

6.4 DISCUSSION

6.4.1 Field evaluation

Phenotypic, genotypic and environmental correlations were estimated for the yield-related traits measured under fully irrigated and water stress conditions. Correlations coefficients are indicative of the relations between yield and its components and can facilitate phenotypic selection because they allow the prediction of the simultaneous change in two or more traits, which can be useful especially when one of the traits is difficult to measure or has low heritability (Rangel et al., 1980). According to Ferreira et al. (2003), phenotypic correlations are estimated directly from phenotypic covariances and are, therefore, the result of both genetic and environmental factors. Genotypic correlations are estimated from genotypic covariances, which exclude the environmental variances and, therefore, are better used in breeding programs because they have a heritable nature. Strong positive genotypic correlations were found between TLN and PANN both in non-stress (0.87) and stress (0.95) treatments, indicating that the selection for one of these traits will act on the selection of the other one. Strong positive phenotypic correlation was also found between tiller number and panicle number (0.99) in a previous study using *O. glumaepatula* as a donor parent in a BC₂F₂ inter-specific population (Brondani et al., 2002). These authors affirmed that these traits can affect plant architecture and grain yield. In the present work a strong positive genotypic correlation was also found between YLD and SF in stress (0.87), indicating that this might be the strongest component of YLD under water stress. Kumar et al. (2007) found a strong negative genotypic correlation between grain yield under stress and spikelet sterility (-1.00) in a double haploid population derived from an intra-specific (*indica* X *japonica*) cross and suggested that the maintenance of high spikelet fertility is an important determinant of yield under stress. However, spikelet sterility can also be an effect of the genetic incompatibility between the two parents and be the result of gamete abortion (Lanceras et al., 2004; Rangel et al., 2007). Lanceras et al. (2004) evaluated a double haploid intra-specific (*indica* X

japonica) population in four irrigation treatments and found that, even under well watered conditions, a high proportion of sterile spikelets was observed. According to these authors the genetic incompatibility between the parents could confound the effect of water stress in the percentage of sterile spikelets, but if there is a difference between the means under well watered and water stress conditions, it can be suggested that drought is affecting spikelets' fertility. In the present work means for SF in non-stress and stress conditions were 72.99% and 49.53%, respectively. Considering that under fully irrigated conditions all sterility observed was due to the genetic incompatibility between the parents, it can be assumed that the difference (23.46%) was due to water stress.

Days to flowering is also considered to be a major determinant of yield under water stress, especially as a drought-escape mechanism, because early maturing plants would be able to escape drought when it occurs during the reproductive stage (Fukai et al., 1999). According to Xu et al. (2005), days to flowering can be managed as a drought escape mechanism in cultivars that are targeted to be grown in environments with well defined drought periods in a way where plants are able to fill the grains before the stress is too severe. Most families showed flowering delays in comparison with the cultivated parent BRSMG Curinga, which flowered, on average, 93 and 92 days after sowing in non-stress and stress treatments, respectively. The observation of DTF means of all 142 BC₂F₂ families revealed that the families that showed the highest flowering delays also showed the lowest yield means under water stress. Lanceras et al. (2004) found from intermediate to high negative correlations between days to flowering and yield under stress and affirmed that the lines that flowered after water stress was established, suffered more yield losses. Considering that, in the present work, water stress was applied to all genotypes at the same time, it can be suggested that the late maturing plants were not able to escape drought and that grain filling was not efficient. The opposite scenario was not observed, since the early maturing families did not always show the highest yield means, indicating that there were other factors influencing yield under stress. The relation between days to flowering and yield can be simply the result of plants' ability to direct photo-assimilates to fill the grains in early stages (Bolaños et al., 1990). This is corroborated by the correlation found between YLD and DTF in stress (-0.41), which was only intermediate. In addition, it must be considered that a trait as complex as yield under stress is influenced by several factors and days to flowering is only one of them. The performance of the families under stress was the result of their performance on all yield components and their ability on responding to water stress.

The average yield reduction in the BC₂F₂ due to water stress was 60% and ranged from 4.8% to 96.9%. These values show that there was a wide range of variation between families and

that the ones that showed a low percentage of yield reduction were more stable between water treatments, maintaining reasonable levels of grain yield during water deficit but also showing high yielding potential under fully irrigated conditions. From the 142 families evaluated, 11 showed high grain yield means, which were statistically superior to the control BRS Soberana ($p < 0.05$) but not to BRSMG Curinga, both under non-stress and stress conditions, showing that these families were stable across both conditions. Transgressive segregants showing significant higher means than the cultivated parent (BRSMG Curinga) were observed for TLN and PANN in non-stress and GPP, TLN, PANN and 100GW in stress, which are important yield components. The presence of transgressive segregants is expected in wide crosses and the genetic basis of transgressive segregation has been attributed to heterosis, which is more pronounced in first-generation hybrids (Kuczynska et al., 2007). However, according to Rieseberg et al. (1999), heterosis has a genetic basis that is quite distinct from that underlying transgressive segregation and should be considered as only partly responsible for transgressive segregation. Heterosis is observed when most individuals are heterozygous for most loci in early generations and is simply due to the presence of alleles from both parents in each locus, while the best explanation for the genetic basis of transgressive segregation is given by complementary gene action and/or allele complementation in one locus (Rieseberg et al., 1999). Assuming that parental lines are fixed for sets of alleles that have opposite effects within these lines, then extreme phenotypes are the result of complementary action of additive alleles that were dispersed between the parental lines. In addition, contrary to heterosis, that is maintained only during the first hybrid generations, transgressive phenotypes are highly heritable (Rieseberg et al., 1999). Rangel et al. (2005) evaluated BC_2F_4 introgression lines containing *Oryza glumaepatula* introgressed chromosomal segments and demonstrated that wild introgressions were responsible for a superior performance of transgressive families in advanced generations and that it was not associated with heterosis, suggesting that the wild alleles were responsible for a long term increased performance of these families.

The evaluation of yield components helps the understanding of how they are influenced by water stress and how they act on final yield. Yield itself (given by grain production per hectare) represents the outcome of families' performance under drought and is the result of several metabolic and genetic mechanisms that are activated in response to water stress. The evaluation of yield and its components in a context where yield is the result of the expression of a series of specific genes in response to water stress allows the identification of genotypes that show the best response mechanisms to drought and are able to direct their energy towards survival and, at the same time, to keep grain filling, resulting in higher yield under stress and overall yield stability.

In addition, the evaluation of yield in detrimental to secondary traits that influence drought tolerance such as root-related and osmotic adjustment-related traits can be more efficient, since grain yield is easier to measure and is the expected outcome of a drought tolerant genotype (Nguyen et al., 1997; Babu et al, 2003).

6.4.2 Linkage map construction and QTL mapping

A total of 850 molecular markers were surveyed for polymorphism between BRSMG Curinga and GEN1233 and 157 (18.47%) were polymorphic, from which 133 (84.71%) were microsatellites and 24 (15.28%) were MITE-markers. The low rate of polymorphism found for the MITE-markers show that there is low variation in these regions between *O. sativa* and *O. glumaepatula*. The main advantage of MITE-markers is that they have an important role in plant genomes evolution and their polymorphism is easily detectable in a low throughput technique using 1.5% agarose gels. In addition, any polymorphic marker (neither microsatellites nor MITE-markers) was found to fill the gaps at chromosomes 4, 6 and 10, indicating that these regions are conserved between the genomes of *O. sativa* and *O. glumaepatula* and that the gaps could be filled with another class of markers that show more opportunities for polymorphism, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs). Deviations from the expected Mendelian segregation ratio were detected for 31 markers and may have been the result of the high sterility found in this inter-specific cross. The higher deviation of markers towards the cultivated parent shows that BRSMG Curinga's alleles were preferentially sampled in this population, indicating that the sterility acted on a misrepresentation of wild alleles. Marker segregation distortions were observed on previous inter-specific mapping populations using the wild *O. glumaepatula* (Brondani et al., 2001; Rangel et al., 2007), *O. rufipogon* (Causse et al., 1994; Moncada et al., 2001; reviewed by McCouch et al., 2007) and the cultivated African rice *O. glaberrima* (Lorieux et al., 2000). Segregation distortions are the result of high hybrid sterility that is found in inter-specific (McCouch et al., 2007) and intra-specific crosses (Liu et al., 2004b) and are caused by the reduction of recombination due to the genetic distance between the parental lines, gamete competition or abortion of gametes and zygotes (Rangel et al., 2007).

A total of eight QTLs were detected for yield-related traits measured in non-stress and stress treatments. It is known that water stress activates several physiological and biochemical mechanisms that are under the control of several drought inducible genes, acting to protect the cellular machinery and to guarantee plant survival (Chaves & Oliveira, 2004). The majority of these

genes encodes signaling molecules, soluble solutes that accumulate in the cells and proteins involved in the stabilization of other proteins. In addition, constitutive genes that are involved on the basal metabolism of the cell, such as respiration and photosynthesis are of great importance because yield is directly related to carbohydrate synthesis which, in turn, depends on efficient carbon assimilation by the photosynthetic machinery. The search for transcripts around the markers on the peaks of the QTLs detected in this work revealed transcripts related to genes that are known to be expressed under water stress in all QTL peaks. Transcripts for protein kinases were found in the peaks of all QTLs, except in the QTL for PLH in non-stress. Protein kinases are enzymes that modify other proteins by adding a phosphate group and are involved in the signaling processes that are activated by water stress (Xiang et al., 2007). The calcium-dependent protein kinases (CDPK) are a specific group of kinases that are sensitive to Ca^{2+} , an ion that is accumulated in cells in response to stress and acts as a signaling molecule. Once the CDPKs are activated by Ca^{2+} , they can subsequently transduce calcium signals by phosphorylating downstream signaling components. Xiang et al. (2007) identified genes that encode CDPK proteins and tested their action in drought tolerance through the genetic transformation of rice plants. These authors verified that transgenic plants over-expressing CDPK genes accumulated significantly higher contents of proline and soluble sugars during stress than the wild type.

Transcripts from trans-membrane proteins with transporter activity were found in the peaks of all QTLs. These proteins have a crucial role in the response to stress because they act on the osmotic adjustment of the plant cells. When the water deficit begins, one of the first physiological responses of the plant is stomata closure which, in turn, occurs in response to abscisic acid (ABA) (Chaves & Oliveira, 2004). ABA is a phyto-hormone that is produced in the roots in response to water deficit and acts as a long distance signaling molecule. Stomata closure works as a defense mechanism against excessive water loss and helps the maintenance of the osmotic potential of the cells. It is known that, in response to water stress, low-molecular weight osmolytes such as proline, soluble sugars and other small molecules are accumulated in plant cells, resulting in an increase in the osmotic adjustment and a higher drought tolerance (Su & Wu, 2004). The importance of the trans-membrane proteins is given by their role in the transport of these solutes. Transcripts from transcription factors were also found in all QTLs peaks. Transcription factors are proteins that can be activated or deactivated by other proteins and, when activated, bind to specific sequences of the DNA where it regulates transcription. They obviously are activated not only in response to stress and participate in the regulation of the transcription of genes involved in the basal metabolism, but in response to water stress specific

transcription factors act on the induction of the transcription of genes involved in the response to stress.

It could be observed that transcripts from genes expressed in response to stress were found in the peak markers of the QTLs detected for traits measured in non-stress and stress treatments. Although it can not be affirmed that the genes found in these regions were in fact been transcribed in this population under the conditions where it was evaluated, it can be suggested that some level of stress was also present under the fully irrigated condition, which can be explained by the high temperatures found during the field experiment, leading to the expression of drought inducible genes in both conditions. Another explanation could be that drought inducible genes were present in the QTL region but were differentially expressed under fully irrigated and stress conditions. The presence of genes encoding drought tolerance-related proteins in the QTLs regions indicates that they might have contributed to a better response to water stress and were responsible for an increase in drought tolerance. In the other hand, transcripts from proteins that act on the basal metabolism of the cell, such as on cellular respiration and photosynthesis, were found in the peak of the QTLs detected for TLN and 100GW in non-stress and for TLN and PANN in stress. The presence of these transcripts show that these genes are present at the QTLs regions and that they might have been transcribed in the population, which reinforces the direct importance of photosynthesis to yield, since PANN and 100GW are important yield components and total yield depends ultimately on the conduction of carbohydrates to grain filling. It also indicates that these genes were probably regularly expressed both under non-stress and stress conditions and that the inter-specific families were, in general, able to keep the photosynthetic machinery working. The presence of photosynthesis-related genes and drought tolerance-related genes in the QTLs regions could indicate that the performance of the families for these traits was dependent on their ability to positively respond to water stress. This indicates that the families that were able to efficiently respond to stress and showed a better performance for most of these traits might have shown higher yield stability. From the families that had the highest proportion of fertile spikelets under water stress ($p < 0.05$), 39 also had the highest yield means under stress. In addition, from these 39 families, eight also showed a high number of panicles under stress ($p < 0.05$) and had the highest averages for 100 grains weight, indicating that they are candidates to show good yield stability.

The QTLs for SF in non-stress (*qSFn11*) and stress (*qSFs11*) and for YLD in stress (*qYLDs11*) treatments were located on the same region of chromosome 11 (RM26646-RM26999), as well as the QTLs for TLN and PANN in stress (*qTLNs11* and *qPANNs11*), that also co-localized in another region of chromosome 11. This indicates that the same genes are being expressed in the QTLs that

co-localize and that the traits should be highly correlated. This observation is corroborated by the high correlation coefficients found between YLD in stress and SF in stress (0.87), YLD in stress and SF in non-stress (0.72) and between TLN and PANN in stress (0.95). These regions are candidates for marker assisted selection aiming to keep or eliminate favorable or unfavorable wild alleles in the regions of interest for the development of introgression lines (ILs) or near isogenic lines (NILs). If the same QTLs are detected in different populations and environments, targeting them for marker assisted selection can be more accurate.

A comparison between the QTLs detected in this work and QTLs previously detected for yield-related traits under water stress conditions was performed. For the comparison, the positions (in base pairs) of the markers that were associated to QTLs in the reference works were searched in the "Rice Gramene Annotated Nipponbare Sequence 2006 Map" available at Gramene web site. QTLs were assumed to be in coincident only if the QTLs from the reference works were in a region that was comprised by the interval of the QTLs detected in the present work, in base pairs. This survey indicated that the QTL detected for YLD in stress was in the same region of chromosome 11 as the QTL detected by Laffite et al. (2004) for grain yield. These authors evaluated intra-specific (*indica* X *japonica*) recombination inbred lines for yield and yield components under fully irrigated and water stress conditions and detected one QTL for grain yield on chromosome 11 in a marker interval that ranged from ~10,000,000bp to 21,390,093bp (A123615-C189), spanning the same QTL interval for YLD in stress in the present work (RM26646-RM26999; from 14,908,996bp to 22,097,224bp. A search for coincident QTLs was also performed with the previous work that used *O. glumaepatula* as the donor parent in a backcross population (Brondani et al., 2002) and the QTLs detected for TLN and PANN in stress in the present work co-localized with the ones detected for the same traits in the reference work. The QTLs detected by Brondani et al. (2002) were located in an interval around peak marker RM4 on chromosome 11 in the position 932,068, which is comprised by the interval 442,099-2,836,106 (RM7173-RM26105) on which the QTLs for TLN and PANN were located in the present work. The co-localization of QTLs on different mapping populations in independent studies indicates that candidate genes located in these regions could be targeted for further search of tighter associations through fine mapping or association mapping and could be identified and used for marker assisted selection, or cloned and transferred to other cereal species of economic interest such as wheat, barley and oat.

6.4.3 Contribution of *Oryza glumaepatula* alleles to drought tolerance

This work is the first to use the wild *O. glumaepatula* as the donor parent in a cross aiming to identify wild alleles contributing to drought tolerance. Despite the fact that *O. glumaepatula* occurs in environments without water restriction (flooded depressions or riversides), it is expected to have alleles on genes expressed in response to abiotic stresses, which can contribute to increase the yield stability of cultivated rice in more restricted environments. Since *O. glumaepatula*'s life cycle depends on water availability and plant growth only occurs under flooding, it can be assumed that this species, in general, is not provided with mechanisms that are directly involved in drought tolerance, such as those related to the control of water loss through transpiration. However, the accession that was used in this work (GEN1233) was collected in the Cerrado Biome, which is characterized by low fertility acidic soils. It can be hypothesized that this accession has a well developed root system which allows its growth in this restrictive condition and that the genes responsible for this characteristic could be transferred to cultivated rice.

The identification of transgressive segregants for TLN and PANN in non-stress and GPP, TLN, PANN and 100GW in stress shows the potential contribution of *O. glumaepatula* alleles to increase yield in rice, even under drought stress. Brondani et al. (2002) detected transgressive segregants in an inter-specific backcross population from an *O. glumaepatula* X *O. sativa* cross and affirmed that the transgressive variation is an important evidence of the favorable effects of wild introgressions in the *O. sativa* background. According to McCouch et al. (2007), a high frequency of positive transgressive segregants was observed in inter-specific populations that were obtained from crosses using the wild *O. rufipogon* as the donor parent. These authors affirmed that specific *O. rufipogon* introgressions were found to be associated with a superior performance across several genetic backgrounds and environments. Since transgressive segregation is the result of allele complementation in each locus and not of heterosis, it can be assumed that transgressive segregants can be maintained in advanced generations. The identification of transgressive segregants in the present work shows that *O. glumaepatula* alleles interacted positively with the alleles from the upland cultivar BRSMG Curinga.

The QTLs detected for TLN and 100GW in non-stress and for TLN and PANN in stress had positive effects coming from the wild parent, indicating that the presence of the wild alleles positively complemented the BRSMG Curinga alleles. The positive contribution of *O. glumaepatula*'s alleles to increase tiller number and panicle number was previously observed by Brondani et al. (2002) and the lines derived from the inter-specific evaluated in that work showed good plant architecture, high tillering ability and high plant vigour (Rangel et al., 2005). Modern upland rice varieties normally show low tillering ability, which results in poor ground coverage and favours the development of weeds. The development of upland rice lines that show good yield

stability under water stress and that, at the same time, are able to efficiently compete with weeds, could bring new opportunities to breeding programs. From the 142 BC₂F₂ families, 11 (12, 35, 40, 59, 92, 99, 122, 127, 128, 129 e 135) showed high yield means both under non-stress and stress conditions, indicating that they had the best yield stability across treatments. Fourteen families (4, 12, 15, 41, 48, 72, 78, 87, 104, 105, 107, 108, 109 and 113) showed number of tillers and panicles in stress statistically superior to BRSMG Curinga ($p < 0.05$). The graphical genotypes (Figure 3) showed that from these 14 families, seven (12, 15, 41, 48, 105, 108 and 113) showed heterozygous introgression in the region of chromosome 11 where QTLs for TLN and PANN in stress were detected. The selection of plants containing homozygous *O. glumaepatula*'s alleles, by marker assisted selection, can increase the phenotypical value of the families for these two traits. It can be observed that family 12 was among the ones that showed the best yield stability and also had high number of tillers and panicles and could be a candidate for further evaluation in advanced generations to originate lines to be used in breeding programs.

Using the graphical genotypes, the wild introgressions can be tagged and their behavior on the next generations can be monitored. If additional backcrosses are performed, the plants with the wild fragment of interest and with higher percentage of the recurrent parent genome (i.e. with reduced linkage drag) can be identified in order to generate introgression lines (ILs) faster and more efficiently. The chromosomal regions with the desired introgressions could be targeted and molecular markers could be used in selection. Using this strategy, one or two more backcrosses could be performed and, at each new generation, the plants could be screened with molecular markers flanking each chromosomal region of interest in order to keep the desired fragments, respectively. By the end of the fourth backcross, a set of families containing only the desired introgressed fragments would be obtained and introgression lines would be developed. These ILs facilitate the exploitation of wild alleles in breeding programs because they carry small wild introgressions in the genetic background of a cultivated parent, which has plant type and characteristics that are desired by plant breeders. In addition, ILs can be the starting point to transfer wild alleles to upland elite rice lines and cultivars. Another interesting strategy is to increase the resolution around a specific QTL region using near isogenic lines (NILs). In this case, the best performed BC₂F₂ families are selected and the desired wild introgression lying on the QTL of interest is monitored, with flanking molecular markers, during the additional backcrosses using the elite genitor as the recurrent parent. These selected plants can be crossed with the elite genitor, aiming the development of hundreds of segregating individuals, which will then be genotyped with a high number of markers on each target genomic region, and phenotyped in field experiments. The availability of a highly saturated genetic map based on molecular markers in rice

is valuable to QTL fine mapping, allowing the identification of markers closely linked to the QTL and the cloning of the QTL (Xie et al., 2006). These markers could be the starting point to identify, due to the availability of the sequenced structural and functional rice genome, the gene responsible for the trait. In this case, the gene could be used to generate a specific molecular marker to be used in marker-assisted selection or could be cloned and transferred by genetic engineering to other cereal species to increase their drought tolerance. The families evaluated in this work will be analyzed in advanced generations and introgression lines will be developed using phenotypic and marker assisted selection. These lines will be readily available to rice breeding programs.

Table 1. Traits mean values and ranges of the BC₂F₂ families (BRSMG Curinga X GEN1233) and two controls (BRSMG Curinga and BRS Soberana) evaluated in fully irrigated (non-stress) and water stress (stress) treatments. Standard deviations (SD) and coefficients of variation (CV) are shown.

Traits	Treatments	Curinga	Soberana	BC ₂ F ₂ families		SD	CV (%)
				Mean	Range		
DTF (days)	Non-stress	93.03	88.30	101.98	82.7-110.7	6.35	6.22
YLD (kg ha ⁻¹)	Non-stress	5096.86	1657.94	3403.86	1373.4-6691.5	1068.84	31.41
GPP	Non-stress	116.08	78.08	98.23	61.1-139.7	16.11	16.39
SF (%)	Non-stress	17.78	45.33	72.99	10.9-50.3	8.79	32.55
TLN	Non-stress	119.66	130.05	109.34	78.1-183.6	16.22	14.47
PANN	Non-stress	88.51	100.76	89.84	53.7-159.2	17.04	18.53
PLH (cm)	Non-stress	83.03	77.92	87.63	70.8-112.5	7.64	8.72
100GW (gr)	Non-stress	2.53	2.45	2.38	1.9-3.5	0.21	8.87
DTF (days)	Stress	92.82	99.24	104.52	81.2-115.7	6.93	6.63
YLD (kg ha ⁻¹)	Stress	2699.68	100.92	1310.40	80.2-3539.6	662.34	50.54
GPP	Stress	66.01	58.10	73.26	45.1-114.1	13.46	18.37
SF (%)	Stress	23.78	86.36	49.53	19.2-86.3	15.49	30.75
TLN	Stress	88.88	86.74	84.27	63.9-139.1	13.68	15.43
PANN	Stress	73.93	75.44	71.38	42.1-109.4	10.66	14.44
PLH (cm)	Stress	72.93	73.10	75.78	62.9-97.2	5.64	7.44
100GW (gr)	Stress	2.22	1.9	2.11	1.42-2.88	0.24	11.39

Means differences were estimated by the Scott & Knott test ($p < 0.05$).

Table 2. Phenotypic (P), genotypic (G) and environmental (E) correlations coefficients (r) estimated between eight traits measured in fully irrigated (non-stress – N) and water stress (stress – S) treatments. Traits abbreviations are described at the Materials and Methods section.

Traits	r	DTF_N	YLD_N	GPP_N	SF_N	TLN_N	PANN_N	PLH_N	100GW_N	DTF_S	YLD_S	GPP_S	SF_S	TLN_S	PANN_S	PLH_S
YLD_N	P	-0.16														
	G	-0.14														
	E	-0.30														
GPP_N	P	0.08	0.42													
	G	0.11	0.47													
	E	-0.03	0.30													
SF_N	P	-0.16	0.51	0.02												
	G	-0.21	0.65	0.02												
	E	0.02	0.14	0.03												
TLN_N	P	-0.23	0.53	0.15	0.21											
	G	-0.26	0.54	0.13	0.32											
	E	-0.16	0.53	0.18	-0.03											
PANN_N	P	-0.32	0.56	0.11	0.26	0.86										
	G	-0.39	0.61	0.07	0.40	0.87										
	E	-0.16	0.48	0.18	0.00	0.84										
PLH_N	P	-0.01	0.19	0.04	0.17	0.04	0.04									
	G	0.00	0.13	-0.03	0.20	0.00	-0.01									
	E	-0.09	0.44	0.26	0.09	0.19	0.17									
100GW_N	P	-0.18	0.10	-0.23	0.03	0.10	0.09	0.09								
	G	-0.26	0.14	-0.29	0.20	0.20	0.18	0.13								
	E	-0.06	0.03	-0.15	-0.20	-0.02	-0.02	0.04								
DTF_S	P	0.91	-0.13	0.13	-0.14	-0.18	-0.28	0.03	-0.20							
	G	0.99	-0.16	0.18	-0.16	-0.21	-0.33	0.04	-0.37							
	E	-0.01	0.03	-0.03	-0.08	-0.08	-0.16	0.02	0.10							
YLD_S	P	-0.28	0.47	0.09	0.42	0.22	0.40	-0.06	0.12	-0.37						
	G	-0.43	0.77	0.19	0.72	0.37	0.67	-0.07	0.29	-0.41						
	E	0.01	-0.01	-0.05	0.00	0.01	0.06	-0.05	-0.04	-0.39						
GPP_S	P	0.20	0.20	0.56	-0.11	-0.10	-0.06	-0.05	-0.26	0.26	0.05					
	G	0.27	0.27	0.78	-0.20	-0.20	-0.15	-0.06	-0.40	0.35	0.09					
	E	-0.07	0.03	0.06	0.08	0.13	0.10	-0.03	-0.08	-0.07	-0.02					
SF_S	P	-0.30	0.36	0.04	0.50	0.20	0.30	0.02	0.11	-0.39	0.75	-0.18				
	G	-0.44	0.55	0.07	0.81	0.32	0.49	0.06	0.23	-0.44	0.87	-0.27				
	E	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.04	-0.07	-0.02	-0.36	0.63	-0.04				
TLN_S	P	-0.21	-0.01	-0.06	0.08	0.04	0.13	-0.04	0.08	-0.24	0.28	-0.11	0.19			
	G	-0.28	-0.01	-0.11	0.16	0.03	0.17	-0.08	0.13	-0.26	0.35	-0.12	0.29			
	E	0.05	0.01	0.04	-0.09	0.05	0.06	0.08	0.01	-0.16	0.20	-0.10	0.03			

Table 2. Phenotypic (P), genotypic (G) and environmental (E) correlations coefficients (r) estimated between eight traits measured in fully irrigated (non-stress – N) and water stress (stress – S) treatments. Traits abbreviations are described at the Materials and Methods section.

Traits	r	DTF_N	YLD_N	GPP_N	SF_N	TLN_N	PANN_N	PLH_N	100GW_N	DTF_S	YLD_S	GPP_S	SF_S	TLN_S	PANN_S	PLH_S
PANN_S	P	-0.19	0.05	-0.04	0.07	0.05	0.16	-0.09	0.11	-0.21	0.30	-0.11	0.19	0.89		
	G	-0.27	0.05	-0.12	0.16	0.08	0.26	-0.16	0.17	-0.25	0.39	-0.13	0.31	0.95		
	E	0.06	0.05	0.11	-0.08	0.01	-0.01	0.08	0.05	-0.11	0.19	-0.06	0.04	0.79		
PLH_S	P	0.08	-0.14	-0.10	0.04	-0.14	-0.12	0.62	-0.08	0.08	0.00	0.04	0.05	-0.01	-0.06	
	G	0.10	-0.18	-0.06	0.05	-0.19	-0.20	0.83	-0.07	0.12	-0.18	0.03	-0.04	-0.04	-0.13	
	E	-0.04	-0.04	-0.19	0.03	-0.02	0.04	-0.11	-0.09	-0.09	0.27	0.07	0.22	0.08	0.08	
100GW_S	P	-0.24	0.24	-0.16	0.29	0.17	0.23	0.05	0.35	-0.31	0.47	-0.18	0.44	0.01	0.00	-0.07
	G	-0.34	0.35	-0.26	0.42	0.28	0.35	0.11	0.74	-0.37	0.66	-0.30	0.54	0.00	0.01	-0.13
	E	-0.01	0.01	0.02	0.05	-0.02	0.05	-0.10	-0.09	-0.19	0.25	0.03	0.31	0.03	-0.02	0.06

** Significant at $p < 0.01$; * significant at $p < 0.05$.

Table 4. Transcripts identified at markers on the peaks of QTL intervals that are shown in Table 3.

Peak Marker	Marker Position (bp)	Search interval (bp)	Gene ID	Function
RM209	17,771,755	17,600,000 - 17,900,000	LOC_Os11g31190	Trans-membrane protein/Transporter activity
			LOC_Os11g31200	Retrotransposon protein/DNA binding protein
			LOC_Os11g31210	Retrotransposon protein/Translation repression activity
			LOC_Os11g31220	Retrotransposon protein/DNA binding protein
			LOC_Os11g31230	Retrotransposon protein/RNA binding protein/Reverse transcriptase activity
			LOC_Os11g31240	Retrotransposon protein/Reverse transcriptase activity
			LOC_Os11g31300	Retrotransposon protein/DNA binding protein
			LOC_Os11g31310	Retrotransposon protein/DNA integrase activity
			LOC_Os11g31330	Transcription factor/Activity on cell morphogenesis during vegetative growth
			LOC_Os11g31340	Transcription factor/Activity on cell morphogenesis during vegetative growth
			LOC_Os11g31360	Transcription factor/Activity on cell morphogenesis during vegetative growth
			LOC_Os11g31380	Transcription factor/DNA binding protein
			LOC_Os11g31410	Retrotransposon protein/DNA integrase activity/cytochrome-c oxidase activity
			LOC_Os11g31500	TGF-beta receptor binding/DNA gyrase activity/Activity in cell growth regulation
			LOC_Os11g31530	Protein kinase/Expressed during flower development/Expressed in response to stress
			LOC_Os11g31540	Protein kinase/Expressed during flower development/Expressed in response to stress
LOC_Os11g31550	Protein kinase/Expressed during flower development/Expressed in response to stress			
RM1227	27,305,223	27,200,000 - 27,400,000	LOC_Os12g43850	Retrotransposon protein/Reverse transcriptase activity
			LOC_Os12g43890	Trans-membrane protein/Transporter activity
			LOC_Os12g43910	Retrotransposon protein/RNA binding protein/Reverse transcriptase activity
			LOC_Os12g44050	Enzyme/Hydrolase activity
			LOC_Os12g44200	Retrotransposon protein/DNA binding protein/Proteolytic activity
			LOC_Os12g43840	Protein binding/Expressed in response to stress
			LOC_Os12g44110	Trans-membrane protein/Transporter activity/Expressed in response to stress

Table 4. Transcripts identified at markers on the peaks of QTL intervals that are shown in Table 3.

Peak Marker	Marker Position (bp)	Search interval (bp)	Gene ID	Function
RM1227	27,305,223	27,200,000 - 27,400,000	LOC_Os12g43940	Protein kinase domain-containing protein/Expressed in response to stress
			LOC_Os12g43950	Transcription factor/DNA binding protein
			LOC_Os12g43930	Enzyme/Acyl-CoA or acyl binding
			LOC_Os12g43970	Enzyme/Hydrolase activity
			LOC_Os12g44000	Enzyme/Protein binding/Ubiquitin-protein ligase
			LOC_Os12g44010	Enzyme/Hydrolase activity
			LOC_Os12g44030	Enzyme/Hydrolase activity
			LOC_Os12g44060	Nitrate and chloride transporter
			LOC_Os12g44020	Enzyme/Hydrolase activity
			LOC_Os12g44070	Nitrate and chloride transporter
			LOC_Os12g44090	ATP binding protein
			LOC_Os12g44080	Type I hypersensitivity/immediate hypersensitivity response
			LOC_Os12g44100	Peptide transporter protein/Expressed in response to stress
			LOC_Os12g44170	ATP binding protein
			LOC_Os12g44160	Oxidoreductase
			LOC_Os12g44150	Plasma membrane ATPase/Enzyme/ATP binding protein
			LOC_Os12g44190	ATPase/ATP binding protein
RM18451	16,288,604	16,100,000-16,400,000	LOC_Os05g27790	Trans-membrane protein/Transporter activity
			LOC_Os05g27820	Trans-membrane protein/Transporter activity
			LOC_Os05g27920	Protein binding/Acts on signal transduction
			LOC_Os05g27880	Protein binding/Acts on cell adhesion
			LOC_Os05g27930	Transcription factor/DNA binding protein/Expressed in response to stress
			LOC_Os05g27950	Enzyme from the basal metabolism
			LOC_Os05g27960	Hydrolase activity/Acts on glycosil bonds

Table 4. Transcripts identified at markers on the peaks of QTL intervals that are shown in Table 3.

Peak Marker	Marker Position (bp)	Search interval (bp)	Gene ID	Function
RM18451	16,288,604	16,100,000-16,400,000	LOC_Os05g27940	40S ribosomal protein
			LOC_Os05g27980	LOB domain protein 12/Acts on mitochondrion division
			LOC_Os05g28010	Transcription initiation factor
			LOC_Os05g28110	Retrotransposon protein/Protein kinase
RM119	21,227,137	21,120,000-21,320,000	LOC_Os04g35030	CSLH3-cellulose synthase/Acts on the carbohydrate biosynthesis pathway
			LOC_Os04g35060	Nicotinate phosphoribosyltransferase/Acts on nucleic acids metabolic pathways
			LOC_Os04g35080	Protein kinase
			LOC_Os04g35100	Phospholipase C/Acts on signal transduction
			LOC_Os04g35140	Hydrolase activity/Acts on protein metabolism
			LOC_Os04g35090	40S ribosomal protein
			LOC_Os04g35114	Protein kinase
			LOC_Os04g35150	Thioredoxin family protein/Regulation of cell redox homeostasis
			LOC_Os04g35180	Protein grpE/Protein binding and folding activity
			LOC_Os04g35160	Trans-membrane protein/Ion transporter
			LOC_Os04g35210	Leucine Rich Repeat family protein/Protein binding protein
			LOC_Os04g35260	ATP binding protein
			LOC_Os04g35240	Protein kinase/Expressed in response to stress
			LOC_Os04g35250	Transcription factor activity
			LOC_Os04g35270	Alpha-(1,4)-fucosyltransferase/Acts on protein amino acid glycosylation
			LOC_Os04g35290	OsPDIL5-2-Oryza sativa protein disulfide isomerase/Catalytic activity
			LOC_Os04g35320	Retrotransposon protein/Oxireductase activity
			LOC_Os11g01580	Trans-membrane protein/Transporter activity/Sodium, calcium, potassium exchanger
			LOC_Os11g01590	Cytochrome-c oxidase activity/Electron carrier activity
			LOC_Os04g35280	Neutral/alkaline invertase/Hydrolase activity

Table 4. Transcripts identified at markers on the peaks of QTL intervals that are shown in Table 3.

Peak Marker	Marker Position (bp)	Search interval (bp)	Gene ID	Function
RM7173	442,099	300,000 - 500,000	LOC_Os11g01600	Transcription factor/Down regulation of translation in response to stress
			LOC_Os11g01620	Protein kinase/Expressed in response to stress
			LOC_Os11g01630	Retrotransposon protein/DNA binding protein/Reverse transcriptase activity
			LOC_Os11g01670	Enzyme
			LOC_Os11g01700	Retrotransposon protein/DNA binding protein/DNA integrase activity
			LOC_Os11g01730	Enzyme/Acyl-CoA or acyl binding/Oxidoreductase activity
			LOC_Os11g01740	Protein kinase/Protein binding/Regulation of protein amino acid phosphorylation
			LOC_Os11g01760	Peroxidase activity/Cytochrome-c oxidase activity
			LOC_Os11g01780	Enzyme/Protein binding/Ubiquitin-protein ligase
			LOC_Os11g01790	Enzyme/Acyl-CoA or acyl binding/Phosphatase activity
			LOC_Os11g01810	DNA binding protein/Acts on DNA methylation
			LOC_Os11g01820	Trans-membrane protein/Transporter activity/Regulation of pH
			LOC_Os11g01830	Enzyme/Nuclease
			LOC_Os11g01860	Enzyme
			LOC_Os11g01869	RNA binding protein/Interacts selectively with double-stranded RNA
			LOC_Os11g01920	Retrotransposon protein/RNA binding protein/Reverse transcriptase activity
			LOC_Os11g01930	Retrotransposon protein/Trans-membrane protein/Transporter activity
			LOC_Os11g01960	Retrotransposon protein/Calcium ion binding
			LOC_Os11g01970	Retrotransposon protein/DNA binding protein/Proteolytic activity
			LOC_Os11g01980	GTPase activity/Amino acid and derivative metabolism/Function on cell apoptosis
LOC_Os11g02010	Structural molecule activity/Structural Constituent of cell wall			

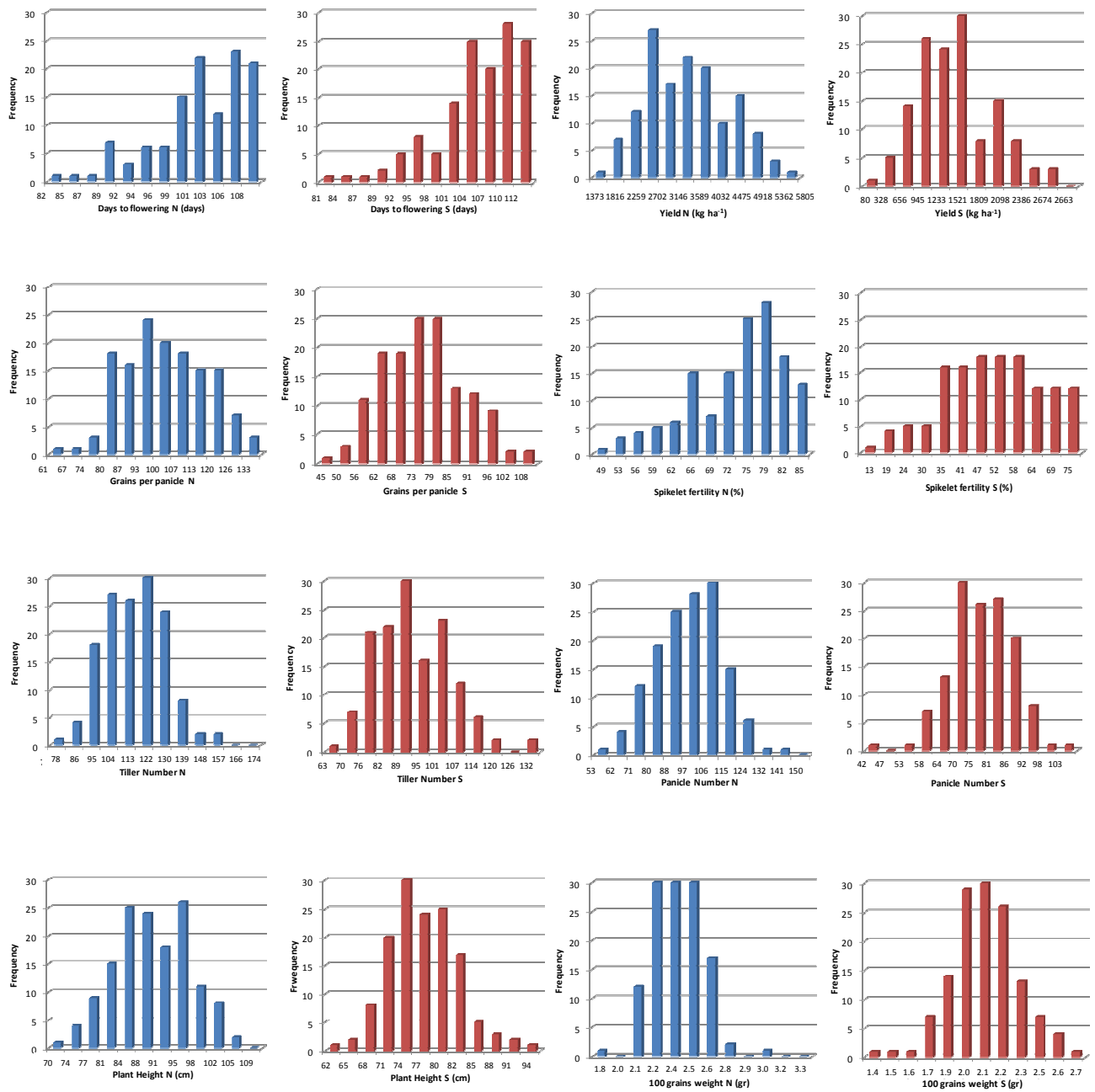


Figure 1. Histograms representing frequencies distributions of eight traits measured in fully irrigated (non-stress (N) – blue columns) and water stress (stress (S) – red columns) treatments for 142 BC2F2 families from the inter-specific cross *O. sativa* (BRSMG Curinga) X *O. glumaepatula* (GEN1233). Black arrows indicate the recurrent parent (BRSMG Curinga) means for each trait. Y-axis represent the frequencies varying from zero to 30 and X-axis represent the means for each trait.

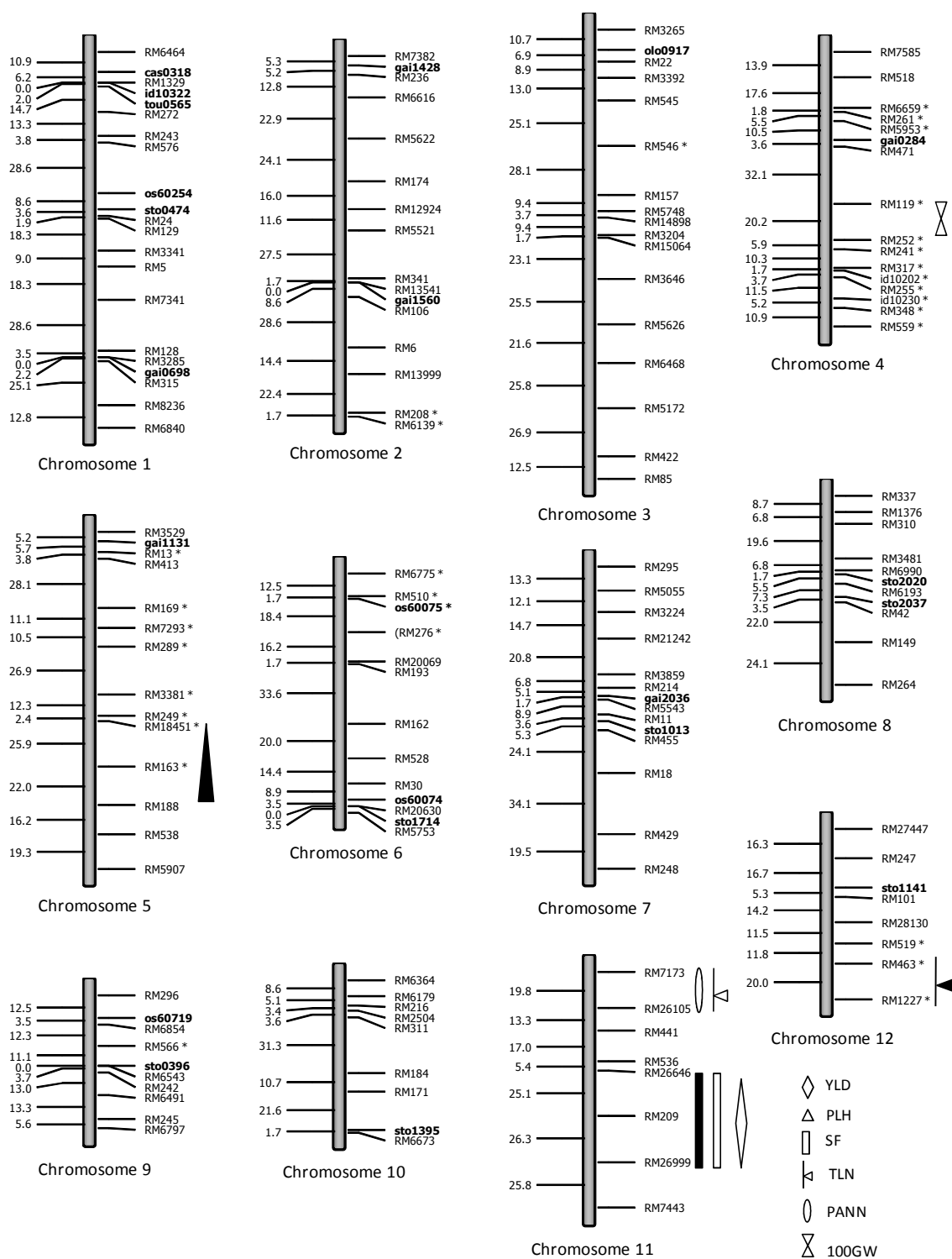


Figure 2. Molecular linkage map of the *O. sativa* (BRSMG Curinga) X *glumaepatula* (GEN1233) inter-specific population. Marker distances are expressed in centimorgans. Distorted markers are indicated with an asterisk. MITE-markers are in bold. Mapped QTLs are shown in Table 4. QTLs legends are shown. Filled symbols represent QTLs detected in non-stress treatment and unfilled symbols represent QTLs detect in stress treatment.

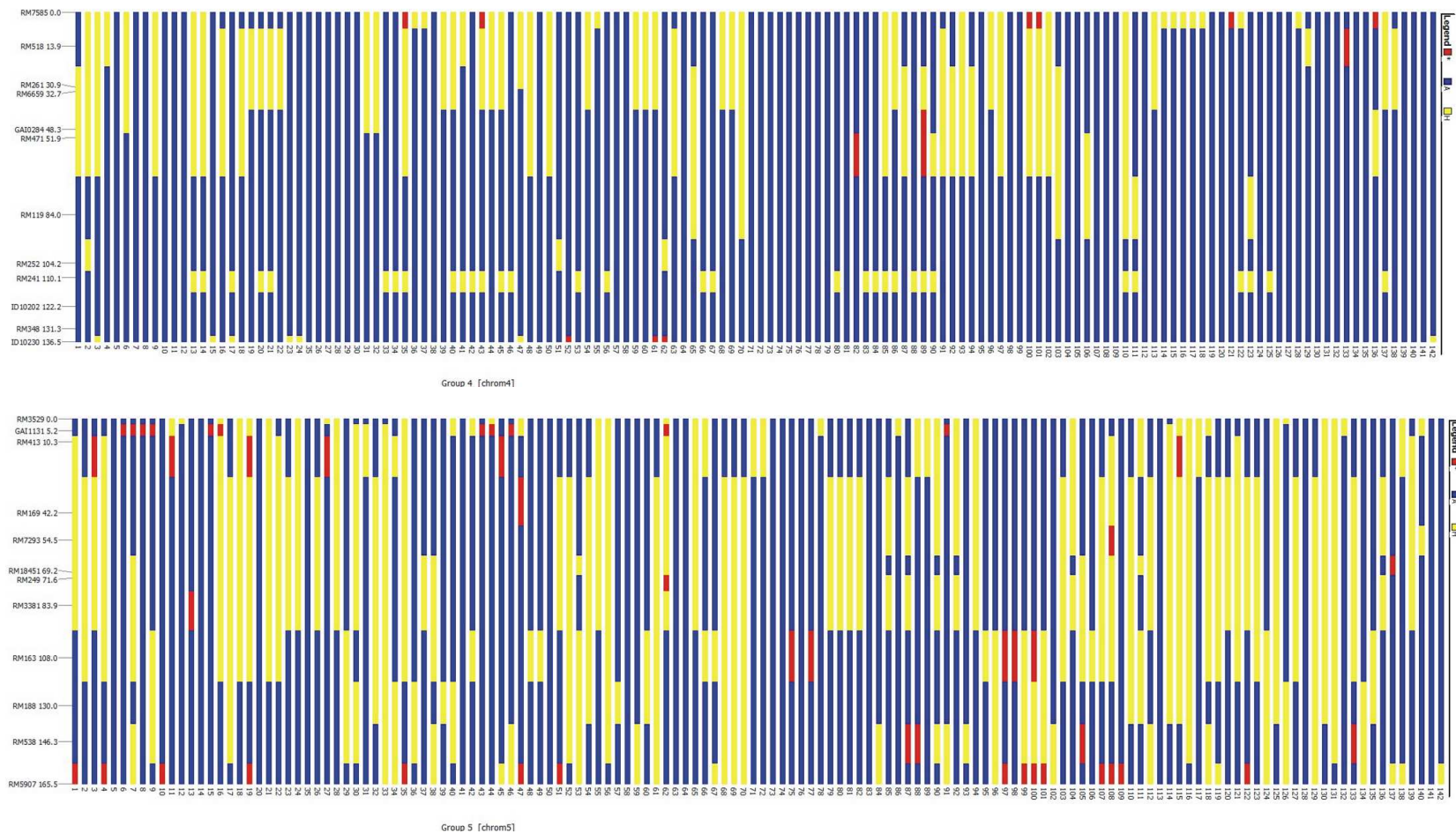


Figure 3. Graphical genotypes of 142 BC₂F₁ plants from the inter-specific cross *O. sativa* (BRSMG Curinga) X *O. glumaepatula* (GEN1233) from chromosomes 4, 5, 11 and 12. Blue bars show the proportion of the genome that correspond to homozygous fragments from BRSMG Curinga, yellow bars show wild heterozygous introgressions (BRSMG Curinga/GEN1233) and red bars represent missing data.

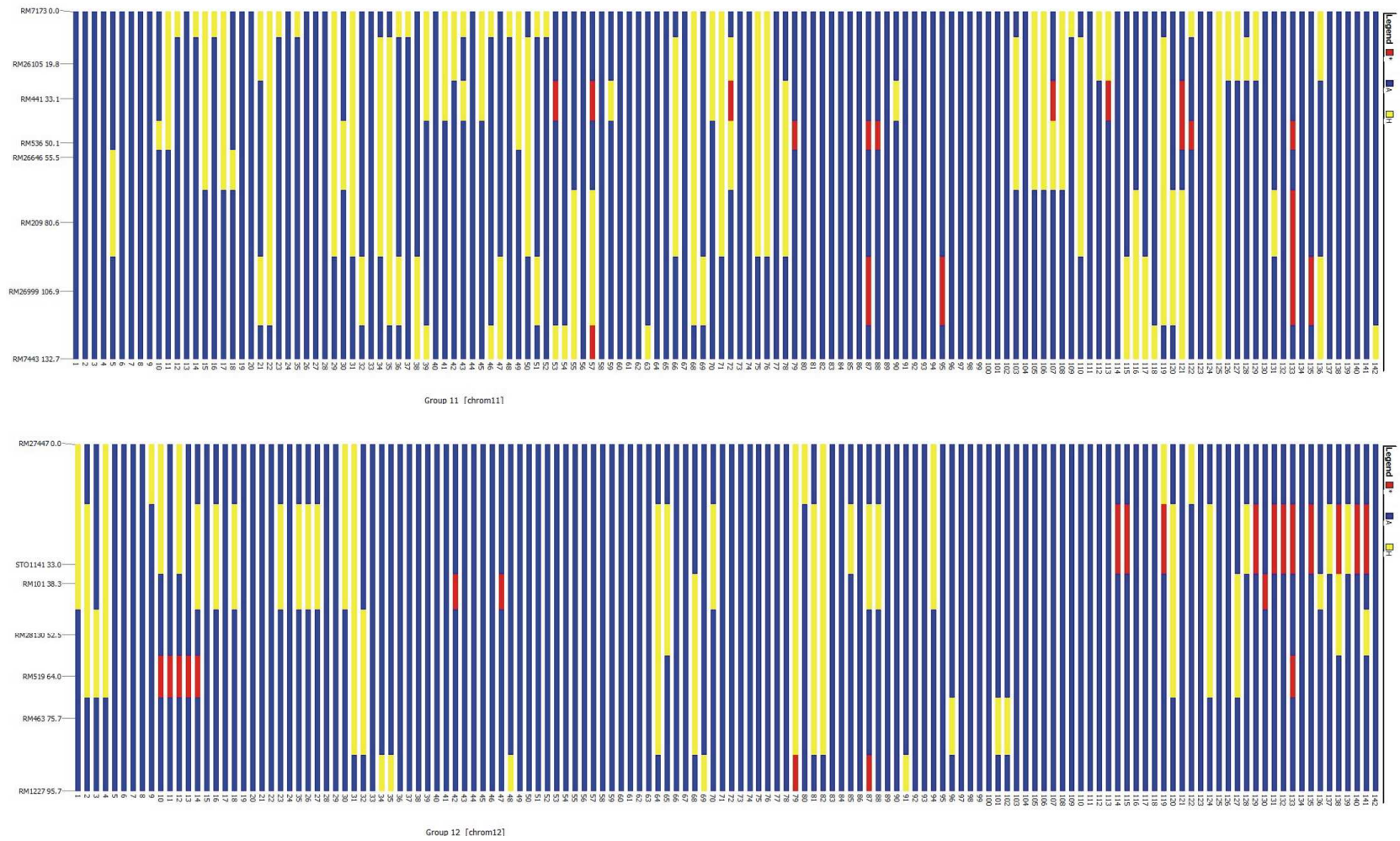


Figure 3. Graphical genotypes of 142 BC₂F₁ plants from the inter-specific cross *O. sativa* (BRSMG Curinga) X *O. glumaepatula* (GEN1233) from chromosomes 4, 5, 11 and 12. Blue bars show the proportion of the genome that correspond to homozygous fragments from BRSMG Curinga, yellow bars show wild heterozygous introgressions (BRSMG Curinga/GEN1233) and red bars represent missing data.

5.5 BIBLIOGRAPHY

- Babu RC, Nguyen BD, Chamarek V, Shanmugasundaram P, Chezian P, Jeyaprakash P, Ganesh SK, Palchamy A, Sadasivam S, Sarkarung S, Wade LJ, Nguyen HT. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: association between secondary traits and field performance. *Crop Science*. 43:1457-1469. 2003.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem* 196:80-83. 1991.
- Benjamin Y, Hocheberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistics Society* 57:289-300. 1995.
- Bolaños J, Edmeades GO, Martinez L. Mejoramiento para tolerancia a sequía en maíz tropical: la experiencia del CIMMYT. XVIII Congreso Nacional de Maíz y Sorgo, Vitória-ES-Brasil. 1990.
- Brar DS, Kush GS. Alien introgression in rice. *Plant Molecular Biology*. 35:35-47. 1997.
- Brondani C, Brondani RPV, Rangel, PHN, Ferreira, ME. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the inter-specific cross *Oryza glumaepatula* X *Oryza sativa*. *Hereditas* 134:59-71. 2001.
- 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.
- Brondani RPV, Zucchi MI, Brondani C, Rangel PHN, Borba TCO, Rangel PN, Magalhães MR, Vencovsky R. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica*. 125:115-123. 2005.
- Casa AM, Brower C, Nagel A, Wang L, Zhang Q, Kresovich S, Wessler SR. The MITE family *hartbreaker* (*Hbr*): molecular markers in maize. *Proceedings of the National Academy of Science: USA*. 97:10083-10089. 2000.
- Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, et al. Saturated molecular map of the rice genome based on an inter-specific backcross population. *Genetics* 138:1251-1274. 1994.
- Chaves MM, Oliveira MM. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. 55:2365-2384. 2004.
- Churchill GA, Doerge RW. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*. 138:963-971. 1994.

- Close TJ, Lammers PJ. An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiology*. 101:773-779. 1993.
- Cruz CD. Programa Genes versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.
73. 2005.
- Embrapa – Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de produção, N° 3. 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 21 de outubro de 2007.
- FAO – Food and Agriculture Organization. FAO STATS. 2005. Disponível em: www.faostat.fao.org. Acesso em: 29 de outubro de 2007.
- FAO – Food and Agriculture Organization. FAO STATS. 2006. Disponível em: www.faostat.fao.org. Acesso em: 30 de fevereiro de 2007.
- Ferreira MAJF, Quiroz MA, Braz LT, Vencovsky R. Correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente entre dez caracteres de melancia e suas implicações para o melhoramento genético. *Horticultura Brasileira*. 21:438-442. 2003
- Fukai S, Cooper M. Development of drought-resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Research*. 40:67-86. 1995.
- Fukai S, Pantuwan G, Jongdee B, Cooper M. Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. *Field Crops Research*. 64:61-74. 1999.
- Grzebelus D. Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers. *Journal of fruit and ornamental plant research*. 14:21-29. 2006.
- Guimarães CM, Santos AB, Magalhães AM, Stone LF. Sistemas de cultivo. In: Santos AB, Stone LF, Vieira NR (eds). *A cultura do arroz no Brasil*. 2ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2006, Capítulo 3, pg. 53-96.
- Gur A, Zamir D. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *Plos Biology*. 2:1610-1615. 2004.
- Kijne JW. Abiotic stress and water scarcity: identifying and resolving conflicts from plant level to global level. *Field Crops Research*. 97:3-18. 2006.
- Kumar R, Venuprasad R, Atlin GN. Genetic analysis of rainfed lowland rice drought tolerance under naturally-occurring stress in eastern India: heritability and QTL effects. *Field Crops Research*. 103:42-52. 2007.
- Kuczynska A, Surma M, Kaczmarek Z, Adamski T. Relationship between phenotypic and genetic diversity of parental genotypes and the frequency of transgression effects in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding*. 126:361-368. 2007.

- Lafitte HR, Price AH, Courtois B. Yield response to water deficit in an upland rice mapping population: associations among traits and genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 109:1237-1246. 2004.
- Lanceras LC, Pantuwan G, Jongdee B, Toojinda T. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiology*. 135:384-399. 2004.
- Liu L, Lafitte R, Guan D. Wild *Oryza* species as potential sources of drought-adaptive traits. *Euphytica*. 138:149-161. 2004a.
- Liu HY, Xu CG, Zhang Q. Male and female gamete abortions, and reduced affinity between the uniting gametes as the causes for sterility in an indica/japonica hybrid in rice. *Sexual Plant Reproduction*. 17:55-62. 2004b.
- Lorieux M, Ndjioudjop N and Ghesqui re A. A first inter-specific *Oryza sativa* X *Oryza glaberrima* microsatellitebased genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 100:593-601. 2000.
- Maclean JL, Dawe DC, Hardy B, Hetter GP. *Rice Almanac*. 3ed: IRRI, Los Baños, Phillipines. p. 59-235. 2002.
- Manickavelu A, Nadarajan N, Ganesh SK, Gnanamalar RP, Babu RC. Drought tolerance in rice: morphological and molecular genetic consideration. *Plant Growth Regulation*. 50:121-138. 2006.
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Wlaton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*. 9:199-207. 2002.
- McCouch SR, Sweeney M, Li J, Jiang H, Thomson M, Septiningsih E, Edwards J, Moncada P, Xiao J, Garris A, Tai T, Martinez C, Tohme J, Sugiono M, McClung A, Yuan LP, Ahn SN. Through the genetic bottleneck: *O. rufipogon* as a source of trait-enhancing alleles for *O. sativa*. *Euphytica*. 154:317-339. 2007.
- Moncada P, Martinez CP, Borrero J, Chatel M, Gauch H, Guimaraes E, Tohme J, McCouch SR. Quantitative trait loci for yield and yield components in an *Oryza sativa* X *Oryza rufipogon* BC2F2 population evaluated in an upland environment. *Theoretical and Applied Genetics*. 102:41-52. 2001.
- Morais OP, Castro EM, Soares AA, Guimarães EP, Chatel M, Ospina Y, Lopes AM, Pereira JA, Utumy MM, Centeno AC, Fonseca JR, Breseguello F, Guimarães CM, Bassinello PZ, Prabhu AS, Ferreira E, Souza NRG, Souza MA, Reis MS, Santos PG. BRSMG Curinga: cultivar de arroz de terras altas de ampla adapta o para o Brasil. Comunicado tecnico 114. Embrapa CNPAF: Santo Ant nio de Goiás, Goiás. 2005. 8p.

- Nguyen HT, Babu RC, Blum A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Science*. 37:1426-1437. 1997.
- Rafalski, A. Applications of single nucleotide polymorphism in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 5, p. 94-100, 2002.
- Rangel PHN, Galvao JD, Silva JC, Cardoso AA. Correlações fenotípicas, genotípicas e de ambiente em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Ceres*. 27:188-195. 1980.
- Rangel PHN, Brondani C, Rangel PN, Brondani RPV, Zimmermann FJP. Development of rice lines with gene introgression from the wild *Oryza glumaepatula* by the AB-QTL methodology. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 5:10-21. 2005.
- Rangel PN, Brondani RPV, Rangel PHN, Brondani C. Comparative linkage mapping of *Oryza glumaepatula* and *Oryza sativa* inter-specific crosses based on microsatellite and expressed sequence tag markers. *Genetics and Molecular Biology*. 30:614-622. 2007.
- Rieseberg LH, Archer MA, Wayne RK. Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*. 83:363-372. 1999.
- Rubim MAL. A case study on life-history of wild rice: from germination to emergence of inflorescence. In: Morishima H; Martins PS. Investigations of plant genetic resources in the Amazon Basin with the emphasis on the genus *Oryza*. Report of 1992/93 Amazon project. 100p. 1994.
- Su J ,Wu R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Science*. 166:941-948. 2004.
- Tanksley SD, Nelson JC. 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*. 92:191-203. 1996.
- Vaughan DA, Morishima H, Kadowaki K. Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology*. 6:139-146. 2003.
- Van Berloo R. GGT: Software for the display of graphical genotypes. *Journal of Heredity*. 90:328-329. 1999.
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics: North Carolina State University, Raleigh, NC. <<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>>. 2005.
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetics*. v. 44, p. 388-396, 1989.
- Xiang Y, Huang Y, Xiong L. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*. 144:1416-1428. 2007.

Xie X, Song MH, Jin F, Ahn SN, Suh JP, Hwang HG, McCouch SR. Fine mapping of a grain weight quantitative trait locus on rice chromosome 8 using near-isogenic lines derived from a cross between *Oryza sativa* and *Oryza rufipogon*. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:885-894. 2006.

Xu JL, Lafitte HR, Gao YM, Fu BY, Torres R, Li ZK. QTLs for drought escape and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 111:1642-1650. 2005.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta Tese de Doutorado teve como principal objetivo avaliar a contribuição da espécie silvestre *Oryza glumaepatula* como doadora de alelos para aumento de produção em dois cruzamentos interespecíficos, o primeiro em experimento conduzido no sistema de cultivo irrigado utilizando famílias RC₂F₈ (*O. sativa* RS-16 x *O. sativa* BG90-2), e o segundo conduzido no sistema de cultivo de sequeiro com e sem estresse de seca utilizando famílias RC₂F₂ (*O. glumaepatula* GEN1233 x *O. sativa* BRSMG Curinga). As caracterizações agrônômica e molecular de 35 linhagens de introgressão do cruzamento RS-16 X BG90-2, derivadas do primeiro cruzamento interespecífico com esta espécie realizado no Brasil, e iniciado em 1996, permitiu a identificação de seis linhagens mais produtivas em cinco locais de avaliação. A caracterização molecular feita com 92 marcadores microssatélites revelou que as linhagens mais produtivas apresentaram as menores proporções de introgressão do parental silvestre, indicando que o método de AB-QTL foi eficiente em eliminar grandes fragmentos de *O. glumaepatula*, reduzindo o “linkage drag” e permitindo a obtenção de linhagens de introgressão produtivas, com maior variabilidade genética e que mantiveram as características favoráveis do parental cultivado. Este resultado é importante, pois estas linhagens de introgressão podem ser utilizadas como genitores em cruzamentos para transferência desta característica a outros genótipos elite de arroz. Neste caso, os marcadores relacionados com os fragmentos da espécie silvestre podem ser utilizados para selecionar os indivíduos promissores, ainda no estágio de plântula, e que seguirão adiante no programa de melhoramento ou que eventualmente venham a ser submetidos a retrocruzamentos adicionais, sem a necessidade de esperar até o final do ciclo para serem concluídas as avaliações de produção e suas características componentes, para só então selecionar as plantas favoráveis para os cruzamentos. A análise de regressão simples realizada para a característica produção de grãos avaliada nas ILs mostrou que o marcador RM1 esteve relacionado a esta característica nas duas gerações em que esta população foi avaliada, RC₂F₂ e RC₂F₈. Este resultado indica que a região deste marcador pode ser alvo para a busca por genes candidatos relacionados ao aumento do potencial produtivo do arroz. As linhagens de introgressão avaliadas neste trabalho possuem estão disponíveis para o programa de melhoramento da Embrapa Arroz e Feijão e uma delas, a CNAi 9930, está sendo recomendada para cultivo em agricultura familiar porque apresenta boa qualidade de grãos e alta produção na soca, o que aumenta a sua produtividade total em até 30%.

Para o segundo cruzamento interespecífico BRSMG Curinga (*O. sativa*) X GEN1233 (*O. glumaepatula*), um mapa de ligação foi construído com 157 marcadores moleculares (133 microssatélites e 24 maracadores MITEs) cobrindo uma região de 1721,47cM do genoma do arroz

com uma distância média entre marcadores de 10,9cM. O mapeamento de QTLs para características relacionadas à produção avaliadas em dois tratamentos, sob irrigação por aspersão e sob estresse hídrico, em 142 famílias RC₂F₂ deste cruzamento permitiu a identificação de oito QTLs, sendo quatro detectados no tratamento irrigado e quatro sob estresse hídrico. Foram identificados QTLs para as características fertilidade de espiguetas, número de perfilhos, altura de planta e peso de 100 grãos no tratamento irrigado, e produção, fertilidade de espiguetas, número de perfilhos e número de panículas no tratamento com estresse hídrico. Os alelos silvestres contribuíram com efeitos positivos nos QTLs identificados para as características número de perfilhos, altura de planta e peso de 100 grãos no tratamento irrigado e número de perfilhos e número de panículas sob estresse hídrico. A contribuição positiva dos alelos silvestres para as características peso de 100 grãos e número de perfilhos e panículas indica que eles complementaram os alelos do parental cultivado nesses locos. A identificação de segregantes transgressivos, apresentando melhor desempenho que o parental cultivado para as características número de perfilhos, número de panículas, número de grãos por panícula e peso de 100 grãos, corroboram a contribuição positiva desses alelos para a estabilidade de produção na seca e aumento do vigor de planta nessa população. Uma família (número 12) foi identificada como promissora para dar origem a linhagens de introgressão porque apresentou boa estabilidade de produção, mantendo altas médias de produção nos dois tratamentos, e número de perfilhos e panículas significativamente maiores que os do BRSMG Curinga.

Os resultados apresentados neste trabalho confirmaram a expectativa de que a *O. glumaepatula* pudesse gerar uma progênie com desempenho fenotípico favorável, mesmo sob condições de estresse de seca. Diferentemente dos cruzamentos anteriores com *O. glumaepatula*, o genitor recorrente utilizado nesta etapa do trabalho foi uma cultivar de terras altas, ou seja, combinações alélicas favoráveis também podem ser obtidas entre esta espécie silvestre e genótipos com background genético da subespécie *japonica*. A exploração dessa espécie pelos programas de melhoramento pode ser uma estratégia valiosa para o aumento da variabilidade genética do arroz cultivado e para a busca por novos alelos para o aumento da tolerância a outros estresses. Com base em todos os resultados acumulados até o momento envolvendo cruzamentos interespecíficos do arroz com a espécie silvestre *O. glumaepatula*, recomenda-se a utilização contínua de indivíduos das populações coletadas e armazenadas no Banco de Germoplasma como genitores, com a finalidade de serem identificadas novas combinações alélicas que produzam progênies transgressivas em relação aos genitores elite de arroz, e com isto, ampliar a variabilidade genética disponível para os programas de melhoramento de arroz. Outro aspecto relevante é que além desta nova variabilidade genética, o desenvolvimento de

grupos de linhagens de introgressão derivadas de cada cruzamento interespecífico com *O. glumaepatula* são a garantia da preservação dos alelos adaptados às condições edafoclimáticas brasileiras, uma vez que a devastação de áreas onde estas espécies ocorrem na natureza e a erosão genética que ocorre no Banco de Germoplasma devido a perda rápida da viabilidade das sementes da espécie (cinco anos, em média) podem repercutir na sua perda em definitivo. As linhagens de introgressão, neste caso, tem a função de preservar os fragmentos de *O. glumaepatula* no background genético do arroz cultivado, e considerando o conjunto de todos os indivíduos da progênie, podem assegurar a preservação da grande parte da variabilidade genética de cada população de *O. glumaepatula*.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)