

## MELHORAMENTO PARA ACÚMULO DE FERRO EM GRÃOS DE ARROZ

MATHEUS KUNRATH MEYER<sup>1</sup>; JEAN DE OLIVEIRA LOUZADA<sup>2</sup>; CÉZAR AUGUSTO VERDI<sup>2</sup>; PAULO HENRIQUE KARLING FACCHINELLO<sup>2</sup>; EDUARDO VENSKE<sup>2</sup>, CAMILA PEGORARO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [96meyer@gmail.com](mailto:96meyer@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [oliveira.louzada506@hotmail.com](mailto:oliveira.louzada506@hotmail.com); [cezarverdi@yahoo.com.br](mailto:cezarverdi@yahoo.com.br); [phfacchinello@gmail.com](mailto:phfacchinello@gmail.com); [eduardo.venske@yahoo.com.br](mailto:eduardo.venske@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [pegorarocamilanp@gmail.com](mailto:pegorarocamilanp@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Uma dieta composta principalmente por cereais como o arroz (*Oryza sativa* L.) é muito comum em países pobres, levando às pessoas a sofrer com deficiência de micronutrientes (SPEROTTO et al. 2012). A deficiência de ferro é um problema muito comum em humanos, afetando cerca de dois bilhões de pessoas e causando quase um milhão de mortes anualmente em todo o mundo (revisado por BOONYAVES et al. 2017). Para auxiliar a resolução deste problema é proposto a biofortificação de culturas, ou seja, o desenvolvimento de plantas com capacidade de acumular mais ferro (MASUDA et al. 2012). O arroz é uma cultura interessante para biofortificação, pois a deficiência de ferro ocorre principalmente em países em desenvolvimento, onde o arroz é a principal fonte de alimentação (MASUDA et al. 2012). Grãos polidos de variedades de arroz cultivadas fornecem aproximadamente  $2 \mu\text{g.g}^{-1}$  de ferro, no entanto o recomendado é  $15 \mu\text{g.g}^{-1}$  (revisado por BOONYAVES et al. 2017).

A variabilidade genética para conteúdo de ferro em grãos de arroz é estreita, o que dificulta o processo de melhoramento convencional. Ainda, deve-se destacar que a localização do ferro no grão varia de acordo com o genótipo (revisado por SANTOS et al. 2017), resultando em diferentes níveis de perda durante o processamento.

Diante desse cenário, é evidente a necessidade de desenvolver genótipos de arroz com capacidade de manter maiores quantidades de ferro no grão polido, ou seja, genótipos com maior capacidade de acúmulo e internalização desse elemento no grão. Dentre as estratégias, está a identificação de genótipos com maior acúmulo de ferro em grãos polidos seguido de hibridação e posterior seleção de recombinantes superiores. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi conduzir hibridações entre genótipos de arroz com maior acúmulo de ferro no grão.

### 2. METODOLOGIA

As hibridações foram realizadas utilizando-se cinco genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) – Meio Chumbinho, BRS Fronteira, SCS Andosan, EPAGRI 107 e Cachinho – previamente caracterizados por apresentarem maior acúmulo de ferro em grãos integrais e em grãos polidos.

Para realização das hibridações, sementes de cada genótipo foram semeadas em baldes e mantidas em casa de vegetação. Plantas entre os estádios R2 (formação do colar na folha bandeira) e R3 (exserção da panícula) tiveram suas flores emasculadas e foram utilizadas como fêmeas nas hibridações. A emasculação manual foi realizada nas primeiras horas do dia. Na sequência, coletou-se pólen das anteras das plantas utilizadas como machos e procedeu-se a polinização, através da deposição do pólen sobre a flor emasculada.

Realizaram-se hibridações entre todos os genótipos, incluindo seus recíprocos. Plantas que passaram por esse processo tiveram suas panículas protegidas. Após hibridação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até o momento da colheita.

Para avaliar a distância genética entre os acessos, procedeu-se a extração de DNA das folhas utilizando o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (DOYLE; DOYLE 1990). As amostras de DNA liofilizadas foram enviadas para o Laboratório de Serviços de Genotipagem do IRRI (Instituto Internacional de Investigação do Arroz) – Filipinas. Os acessos de arroz foram genotipados com 7098 marcadores SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) utilizando a plataforma de genotipagem 7K Infinium SNP (Illumina®).

Após análise de dados usando o programa TASSEL V.5.2.41 (BRADBURY et al 2007), foram removidos os acessos de arroz com taxa de chamada (*call rates*) < 75% (mais que 25% dos SNPs para aquele acesso não apresentavam leitura). Foram removidos SNPs com leitura em branco (*missing data*) > 20% (para o SNP permanecer na análise é necessário que esteja presente em no mínimo 80% dos acessos) e alelos com baixa frequência (*minor allele frequency*), neste caso  $\leq 5\%$  (alelos que só apareciam até 5% nos acessos testados). A distância entre os acessos foi calculada através do método da identidade por estado (*identity by state* – IBS). Um dendrograma foi obtido pelo método da ligação média entre grupos (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* - UPGMA). Ambas as análises foram feitas usando o programa TASSEL V.5.2.41.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo deu início a um programa de melhoramento para acúmulo e internalização de ferro em grãos de arroz. O programa está em fase inicial, e até o momento obteve-se sementes F<sub>1</sub> provenientes de diferentes hibridações. Foram utilizados cinco genitores que apresentaram maiores quantidades de ferro no grão. Os genótipos foram submetidos a diferentes combinações, incluindo hibridações recíprocas, as quais foram conduzidas para evidenciar a herança materna (genes provenientes do genoma mitocondrial e plastidial) (revisado por BALDISSERA et al. 2012).

Foram obtidas sementes F<sub>1</sub> para a maioria das combinações testadas (Tabela 1), porém com número variável, o que pode ser explicado pelos fatores envolvidos no “índice de pega” da hibridação. O “índice de pega” da hibridação de arroz depende do processo de emasculação (GARCÍA-YZAGUIRRE e CARRERES, 2008), da temperatura ambiente (YOSHIDA, 1981) e dos genótipos utilizados (AGUIAR et al. 2015).

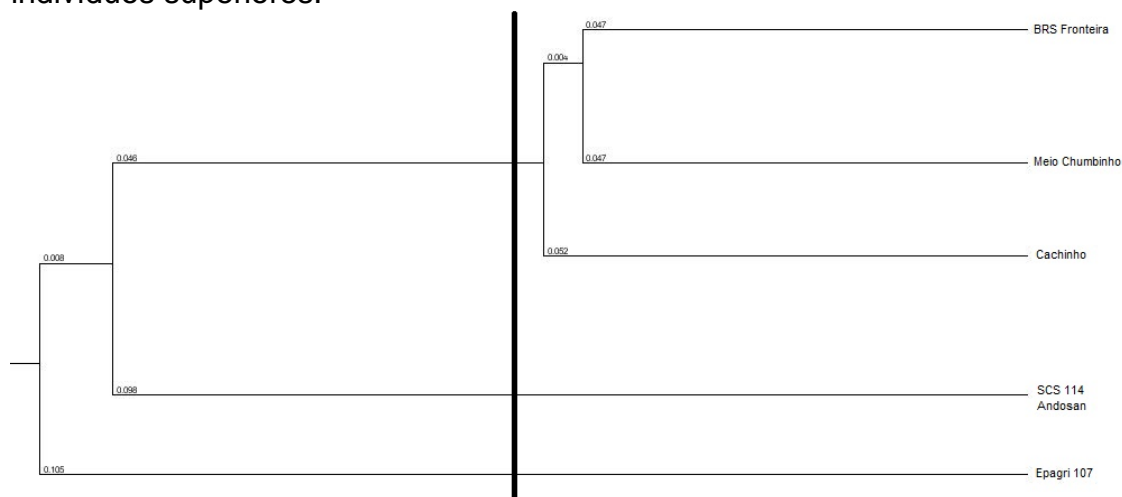
**Tabela 1.** Número de panículas submetidas à hibridação artificial e número de sementes obtido a partir de cada combinação.

Combinações	Nº de panículas	Nº de sementes
BRS Fronteira x EPAGRI 107	5	1
BRS Fronteira x M. Chumbinho	5	11
BRS Fronteira x SCS 114 Andosan	6	2
BRS Fronteira x Cachinho	2	1
Cachinho x EPAGRI 107	3	0
Cachinho x M. Chumbinho	2	5
Cachinho x BRS Fronteira	8	4
Cachinho x SCS 114 Andosan	6	5

EPAGRI 107 x M. Chumbinho	7	9
EPAGRI 107 x SCS 114 Andosan	7	2
EPAGRI 107 x BRS Fronteira	6	7
EPAGRI 107 x Cachinho	2	0
M. Chumbinho x BRS Fronteira	4	1
M. Chumbinho x EPAGRI 107	4	6
M. Chumbinho x SCS 114 Andosan	3	4
M. Chumbinho x Cachinho	0	0
SCS 114 Andosan x BRS Fronteira	4	3
SCS 114 Andosan x Cachinho	5	10
SCS 114 Andosan x EPAGRI 107	2	12
SCS 114 Andosan x M. Chumbinho	3	5

As sementes obtidas serão semeadas para obtenção de plantas  $F_1$ , que darão origem a populações segregantes. As populações serão conduzidas a homozigose e selecionadas para acúmulo e internalização de ferro no grão. Novas hibridações serão realizadas utilizando as mesmas combinações visando à obtenção de maior número de sementes para possibilitar a expressão da variabilidade genética nas populações segregantes.

A genotipagem dos acessos utilizados nas hibridações possibilitou calcular a distância genética e classificar os acessos em três grupos (Figura 1). Os acessos BRS Fronteira, Meio Chumbinho e Cachinho pertencem ao mesmo grupo, indicando que são geneticamente mais próximos. Os acessos SCS 114 e Epagri 107 ficaram em grupos isolados, evidenciando que são geneticamente distantes entre si e dos demais. Esse resultado demonstra que há variabilidade genética entre os acessos utilizados na hibridação, o que levará a formação de populações segregantes promissoras. A hibridação entre indivíduos geneticamente distantes pode gerar novas combinações alélicas que resultem em indivíduos superiores.



**Figura 1.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA em cinco acessos de arroz (*Oryza sativa* L.) utilizando 4973 marcadores SNPs. Linha vertical ilustra a separação em três grupos com base na distância média (0,17).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu dar início ao processo de desenvolvimento de novos genótipos de arroz com maior acúmulo e internalização de ferro no grão. Foram

encontradas dificuldades associadas ao processo de hibridação, uma vez que um pequeno número de sementes híbridas foi obtido. Novas hibridações com a utilização de diferentes técnicas associadas ao processo estão programadas. Estudos paralelos como a caracterização de genótipos quanto ao acúmulo de ferro no grão e o mapeamento associativo para esse caracter estão sendo conduzidos de modo a gerar conhecimento científico para auxiliar os melhoristas.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro e bolsas de estudo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G.A., STRECK, E.A., MAGALHÃES JR., A.M., FAGUNDES, P.R.R., MAIA, L.C., HUBER, M.P., KRÜGER, T.K. Capacidade de combinação e influência das condições ambientais na hibridação de arroz irrigado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO**, Pelotas. Ciência e tecnologia para otimização da orizicultura: anais. Brasília, DF. Sosbai, 2015.
- BALDISSERA, J.N.C, VALENTINI, G., COAN, M.M.D., ALMEIDA; C.B., GUIDOLIN, A.F., COIMBRA, J.L.M. Capacidade combinatória e efeito recíproco em características agronômicas do feijão. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 471-480, 2012.
- BOONYAVES, K., WU, T-Y., GRUISSEM, W., BHULLAR, N.K. Enhanced Grain Iron Levels in Rice Expressing an IRON-REGULATED METAL TRANSPORTER, NICOTIANAMINE SYNTHASE, and FERRITIN Gene Cassette. **Frontiers in Plant Science**, 8:130, 2017.
- BRADBURY, P.J., ZHANG, Z., KROON, D.E., CASSTEVEN, T.M., RAMDOSS, Y., BUCKLER, E.S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, 23, p. 2633-2635, 2007.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- GARCÍA-YZAGUIRRE, A., CARRERES, R. Efficiency of different hybridization methods in single crosses of rice for pure line breeding. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 6(3), p. 395-400, 2008.
- MASUDA, H., ISHIMARU, Y., AUNG, M.S., KOBAYASHI, T., KAKEI, Y., TAKAHASHI, M., HIGUCHI, K., NAKANISHI, H., NISHIZAWA, N.K. Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. **Scientific Reports**, 2:543, 2012.
- SANTOS, R.S., ARAUJO JR., A.T., PEGORARO, C., COSTA DE OLIVEIRA, A. Dealing with iron metabolism in rice: from breeding for stress tolerance to biofortification. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, p. 312-325, 2016.
- SPEROTTO, R.A., RICACHENEVSKY, F.K., WALDOW, V.A., FETT, J.P. Iron biofortification in rice: it's a long way to the top. **Plant Science**, v. 190, p. 24-39, 2012.
- YOSHIDA, S. In: **Fundamentals of rice crop science**. Philippines. IRRI, 1981. 279p.