

IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS AO TEOR DE AMILOSE EM ARROZ

Tereza Cristina de Oliveira Borba¹, Claudio Brondani², João Antônio Mendonça³, Priscila Zaczuk Bassinello⁴, Aluana Gonçalves de Abreu⁵, Raquel Neves de Mello⁶, Luana Alves Rodrigues⁷

Palavras-chave: Amido, Marcadores SNP, GWAS

INTRODUÇÃO

Em países em que o consumo do arroz é expressivo, a qualidade do grão dita o valor de mercado (Fitzgerald et al., 2009). A qualidade de grãos assume diversos aspectos e está fortemente relacionada a fatores culturais, porém os seus atributos são definidos pelo rendimento de grão após beneficiamento, dimensão e formato do grão, qualidades culinárias, sensoriais e nutricionais (He et al., 1999). Entre os fatores que afetam de maneira expressiva as propriedades relacionadas às características sensoriais do grão encontram-se o teor de amilose, temperatura de gelatinização e o conteúdo protéico.

O amido corresponde a, aproximadamente, 90% da matéria seca do arroz polido, o qual também apresenta quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas. O amido é formado por duas estruturas moleculares complementares: a amilose, que constitui a fração linear da molécula e é formada por unidades de (α -1,4)-D-glucosil, e a amilopectina, formada por ligações (α -1,4) e (α -1,6)-D-glucosil (Vandeputte et al., 2003). A amilose, juntamente com outras características físicas e químicas do amido como a consistência de gel e temperatura de gelatinização, fornece informações indiretas sobre as propriedades culinárias e sensoriais do arroz (Wang et al., 07). Porém, embora o teor de amilose influencie de maneira acentuada as propriedades culinárias e sensoriais do grão, cultivares que apresentam teores de amilose similares podem apresentar diferenças expressivas após o cozimento (Juliano, 2003).

Apesar da qualidade de grão apresentar um grande apelo, nem sempre atua como um dos fatores principais no desenvolvimento e adoção de novas cultivares. Os programas de melhoramento, em geral, buscam superar outros importantes desafios como o aumento dos patamares de produtividade diante do crescimento da população mundial. Khush (1997), por exemplo, prevê a necessidade de incremento de quase 300 milhões de toneladas na produção mundial de arroz até o ano de 2025. Logo, existe grande preocupação mundial em relação à segurança alimentar diante do rápido crescimento populacional, em um cenário que inclui a redução da área de plantio, iminente limitação na disponibilidade de recursos hídricos e fatores de estresses bióticos e abióticos. Porém, o mercado consumidor representa um fator de impacto importante na cadeia produtiva do arroz, à qual dita valor diferenciado a cultivares com atributos superiores de qualidade de grão. Os programas de melhoramento podem utilizar este argumento como um incentivo no desenvolvimento de cultivares com perfis diferenciados no mercado, vinculando alta produtividade e outros fatores agrônômicos a atributos de qualidade de grãos superiores.

O desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação de germoplasma com atributos superiores de qualidade de grão permite aos programas de melhoramento a seleção precoce destes atributos, distribuindo e classificando o germoplasma com base em

¹ Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de plantas), Embrapa, Embrapa Arroz e Feijão Rodovia GO462, Km12, Zona Rural 75375-000, Santo Antônio de Goiás/GO, tereza.borba@embrapa.br.

² Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Embrapa.

³ Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de plantas), Embrapa.

⁴ Doutora em Ciências dos Alimentos, Embrapa.

⁵ Doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa.

⁶ Doutora em Agronomia (Fitopatologia), Embrapa.

⁷ Doutora em Agronomia, Embrapa.

informações obtidas em estágios iniciais de desenvolvimento da planta. Além disto, o conhecimento mais detalhado de genes relacionados a atributos de qualidade de grão para a cultura do arroz pode facilitar e auxiliar diferentes objetivos almejados por programas de melhoramento ou por projetos de pesquisa com foco na exploração e utilização da variação natural existente na cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 276 acessos componentes da coleção nuclear de arroz da Embrapa (CNAE) para a composição de um painel não estruturado e dados históricos derivados de GBS (*Genotyping by Sequencing*) e de avaliação para teor de amilose aparente (TAA). Os ensaios de campo foram conduzidos em dois anos consecutivos (safras 2003/2004 e 2004/2005) em um delineamento de blocos aumentados de Federer, com 4 linhas de 5 metros e densidade de 20 plantas m⁻¹ (Borba et al., 2010). Os dados foram obtidos a partir da coleta dos 4 metros centrais das duas linhas intermediárias. Para a análise do TAA foi utilizada a metodologia definida por Juliano (1979).

A análise de associação foi conduzida utilizando-se a análise MLM (*Mixed Linear Model*) disponível no software Tassel versão 3.0, em que os marcadores moleculares testados e os dados da estruturação populacional foram considerados como fatores de efeito fixo e os dados de parentesco (kinship) como fatores de efeito aleatório. A confirmação da significância das associações (p-valor) foi realizada pelo método FDR (false discovery rate), obtido pelo software Qvalue versão 1.0 (STOREY, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados moleculares derivados de GBS foram filtrados para a eliminação de marcadores não polimórficos entre os 276 acessos componentes do painel. Além disto, foram eliminados os alelos raros (frequências inferiores a 5%) para se evitar medidas superestimadas do desequilíbrio de ligação (Remington et al., 2001). Adicionalmente, alelos raros estão sujeitos a apresentar efeitos enviesados ocasionados pela covariância entre marcadores e estruturação populacional, aumentando-se assim a chance de ocorrência de erros tipo I (Bresseghele e Sorrels, 2006). A partir de um total de 445.589 marcadores SNP, após as filtrações realizadas, utilizaram-se 145.261 marcadores polimórficos para as análises de associação.

Utilizando-se a série de dados históricos de qualidade (Tabela 1) e os dados moleculares foi possível identificar marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) associados à TAA. Ao todo, oito marcadores SNP foram associados ao TAA considerando-se o p-valor de $1,72 \times 10^{-7}$ como o limite para a significância das associações verdadeiras.

Tabela 1. Análise estatística descritiva de dados de TAA (%) para a cultura do arroz.

	Safra 2003/2004	Safra 2004/2005
Média	24,3	24,1
Máximo	4	8
Mínimo	31	31
Desvio-padrão	2,5	2,2
BR Irga 409*	27	26
Caiapó*	26	24
Metica 1*	25	25
Colosso*	25	24

*Testemunhas

Todos os oito marcadores foram associados significativamente com os dados dos dois anos de ensaio. Cada marcador explicou, de maneira individual, aproximadamente 13% da variância fenotípica (em média). Além disto, todos os oito marcadores foram localizados no

cromossomo 6, o que é bastante coerente com resultados obtidos previamente em análises de QTL na literatura. Isto porque todos os marcadores foram localizados entre uma distância de 100k do gene *Waxy*. O gene *waxy*, que codifica a enzima *granule bound starch synthase* (GBSS), está ligado à síntese do amido e é considerado um marcador alvo na caracterização dos genótipos para as propriedades deste composto. Quando categorizados quanto à sua classificação pelo *Gene Ontology* (GO), todos os oito marcadores foram classificados como “processos biológicos” e “função molecular”.

Estes marcadores estão, no momento, sendo avaliados quanto a viabilidade de desenvolvimento de ferramentas para SAM (Seleção Assistida por marcadores) como, por exemplo, o desenho de *primers* e a validação das associações identificadas.

CONCLUSÃO

Em programas de melhoramento de arroz, a avaliação dos atributos de qualidade de grãos é conduzida através de análises laboratoriais trabalhosas, demoradas e caras. Desta forma, a identificação e desenvolvimento de marcadores relacionados ao teor de amilose e a sua disponibilização como ferramenta auxiliar na inserção mais ágil de genes associados à qualidade de grãos promova maior eficácia e agilidade aos programas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORBA, T.C.O et al. Association mapping for yield and grain quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). **Genetics and Molecular Biology**, 33, 515-524, 2010.
- BRESEGHELLO, F.; SORRELS, M.E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Genetics** 172:1165-1177.
- FITZGERALD, M. A. et al. Addressing the dilemmas of measuring amylase in rice. **Cereal Chemistry**, v. 86 n. 5, p. 492- 498, 2009.
- HE, P. et al. Genetic analysis of rice grain quality. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 3/4, p. 502-508, 1999.
- JULIANO, B (Ed). **Rice chemistry and quality**. Muñoz, Nueva Ecija (Philippines): Philippine rice research Institute, 2003.
- JULIANO, B. Amilose analysis – A review. **Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality**. Los banos, Philippines, 251-260, 1979.
- KHUSH, G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, 35, 25-34, 1997.
- REMINGTON, D.L. et al. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98,11479-11484, 2001.
- STOREY, J.D. A direct approach to false discovery rates. **Journal of the Royal Statistical Society**, 64: 479-498, 2002.
- VANDEPUTTE, G. et al. Rice starches. III - structural aspects provide insight in amylopectin retrogradation properties and gel texture. **Journal of Cereal Science**, 38, 61-68, 2003.