

USO DE MARCADORES MOLECULARES NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DE ARROZ DA EMBRAPA

¹Luana Alves Rodrigues¹; Tereza Cristina de Oliveira Borba²; Raquel Neves de Mello³; Aluana Gonçalves de Abreu⁴; José Manuel Colombari Filho⁵; Sylvana de Paiva Pinto Costa⁶.

Palavras-chave: estresse biótico e abiótico, ferramentas moleculares, seleção assistida por marcadores

INTRODUÇÃO

A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) é uma importante estratégia que tem sido amplamente utilizada em diversos programas de melhoramento de plantas e animais. Esta consiste na identificação indireta de fenótipos desejáveis por meio do uso de marcadores moleculares. Vários trabalhos relatam a aplicação de marcadores moleculares na pesquisa de arroz (*Oriza sativa* L.) para avaliação da diversidade genética, mapeamento genético, piramidação de genes favoráveis, seleção de plantas tolerantes a doenças e stress abióticos (BALLINI et al., 2008; BORBA et al., 2009; SUH et al., 2009; CHIN et. al., 2010; CHIN et. al., 2011; GOUDA et. al., 2013).

Inúmeras vantagens são observadas no uso de tal estratégia, principalmente aquelas em que a seleção fenotípica possui um custo elevado, subjetivo, ou até mesmo quando o caractere de interesse só se manifesta em fases avançadas de desenvolvimento. Neste sentido foi estabelecida uma área de seleção assistida por marcadores no Laboratório de Biotecnologia na Embrapa Arroz e Feijão em 2014, introduzindo na rotina análises com marcadores moleculares úteis aos programas de melhoramento de Arroz e Feijão. Além disso, esta área também apoia outros programas de melhoramento de plantas como o Algodão.

O objetivo deste trabalho foi quantificar e qualificar o uso da seleção assistida por marcadores moleculares no programa de melhoramento de arroz no período de 2014 a 2017.

MATERIAL E MÉTODOS

A área de seleção assistida da Embrapa Arroz e Feijão foi estabelecida em 2014 e desde então já avaliou diferentes metodologias para a extração de DNA genômico conforme a necessidade exigida para cada tipo de análise (i) lise alcalina para genotipagens em grande escala que não exige DNA de qualidade (XIN et al., 2003; VALDISSER et al., 2013); (ii) CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) para metodologia que exigem DNA de alta qualidade tais como sequenciamento, hibridização e digestão por enzimas (DOYLE; DOYLE, 1990; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998); e (iii) kits comerciais para obtenção de DNA de maior pureza e qualidade. As diferentes metodologias para análise molecular empregadas no programa de melhoramento de arroz da Embrapa são realizadas principalmente em eletroforese capilar e PCR em tempo real, sendo os marcadores mais

¹ Bióloga, Doutora em Agronomia, Analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Caixa Postal: 179. luana.rodrigues@embrapa.br.

² Engenheira de Alimentos, Doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão.

³ Agrônoma, Doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão.

⁴ Bióloga, Doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão.

⁵ Agônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de plantas, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão.

⁶ Zootecnista, Especialização em Biodiversidade, Analista da Embrapa Arroz e Feijão.

utilizados microssatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Foram avaliados os dados levantados ao longo de três anos e meio (2014-2017) de funcionamento e avaliada a evolução das análises de rotina desenvolvidas. Ao todo, foram analisados os dados individuais obtidos (*data point*) ano a ano e também a evolução e inserção de novos marcadores na *pipeline* deste laboratório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro de 2014 a junho de 2017 foram gerados 73.644 *data points* e introduzidos nas análises de rotina do programa de melhoramento de arroz, 17 marcadores. Além disto, um conjunto de 24 marcadores microssatélites já era utilizado para análises de diversidade, verificação de cruzamentos no programa de híbridos, pureza e identidade (BORBA et al., 2009) (tabela 1).

Tabela 1 - Relação de análises realizadas e o número de marcadores introduzido na rotina de seleção assistida no período de 2014- 2017.

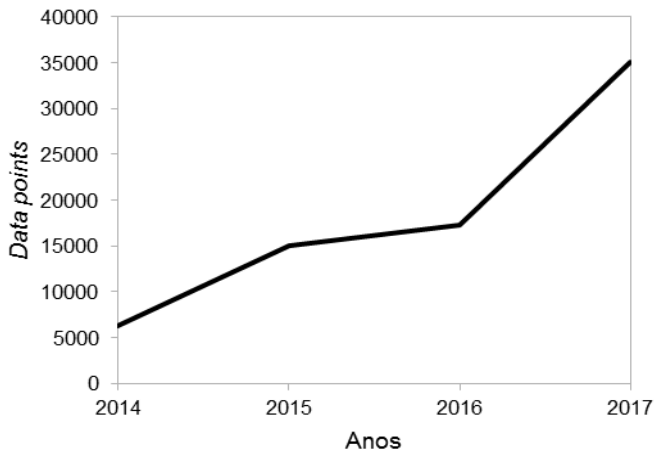
Análises	Data point			
	2014	2015	2016	2017
SSR- diversidade	3456 (6*)	1848 (7*)	12048(4*)	20016(0*)
SSR – Brusone	192	38	294	210
QTL – Brusone	2648	8272	3736	5552
Pi – Brusone		1206	684	9162
Aroma		3676		
Pup1 – fósforo			441	
Qualidade			60	105
Total	6296	15040	17263	35045

* Número de marcadores introduzidos na rotina.

Em 2014 foram gerados 6.296 *data points* e introduzidos um total de seis marcadores referentes à tolerância a Brusone, sendo 02 marcadores SSR individuais (RM25 e RM201) (CHEN et al., 1997) e 04 marcadores associados a 02 QTLs: q2g4 (RM13626, RM1307) e q9g6 (RM3533 e RM242) (BALLINI et al., 2008). No ano de 2015 foram gerados 15.040 *data points* e introduzidos um total de sete novos marcadores, sendo seis marcadores referentes à tolerância a Brusone associados a 03 genes Pi (BALLINI et al., 2007; 2008; GOUDA et al., 2013): Pi 1 (RMS-Pi1-03 e RM5926), Pi 2 (RMs8 e RM564) e Pi 33 (RM544 e RM3507) e um marcador associado à presença de aroma em grãos de arroz (IFAP - EAP - INSP) (BRADBURY et al., 2005). Em 2016 foram gerados 17.263 *data points* e introduzido um total de quatro novos marcadores, sendo 03 referentes à tolerância a fósforo (K-41, K-46.1 e K-59) (mais específico para o cultivo de arroz em sistema de terras altas), associados ao gene Pup1 (CHIN et al., 2010; CHIN et al., 2011) e um marcador associado ao teor de amilose em arroz (RM190) (AKAGI et al., 1996). Nos primeiros 06 meses de 2017 já foram gerados 35.045 *data points*. Entretanto ainda não foi introduzido nenhum marcador novo na rotina, pois ainda se encontram em fase de testes para validação, marcadores para alongação do grão de arroz, identificação da casca dourada em arroz e marcadores SNPs para déficit hídrico. Como se pode observar na figura 1, o uso da seleção assistida por marcadores moleculares tem apresentado um crescimento expressivo a cada ano e novos marcadores são adicionados (tabela 1) conforme a necessidade de cada programa de melhoramento.

Além de marcadores para caracteres pontuais, há muitos trabalhos em andamento com genotipagens de maior densidade como ressequenciamento, Dart-seq (*Diversity Arrays Technology*) e GBS (*Genotyping by Sequencing*) para identificação de novos marcadores SNPs.

Figura 1 - Dados individuais (*data points*) gerados no período de 2014-2017.



CONCLUSÃO

O crescente aumento da demanda e o empenho da equipe em busca de novas ferramentas levará a consolidação de uma plataforma de genotipagem com um quadro de análises diversificado aumentando a eficiência do processo de seleção de genótipos, reduzindo o tempo, o trabalho manual e o custo dos dados gerados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAGI, H. et al., Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. **Theoretical and applied genetics**. v. 93, p. 1071-1077. 1996.
- BALLINI E. et. al. Modern elite rice varieties of the “Green Revolution” have retained a large introgression from wild rice around the *Pi33* rice blast resistance locus. **New Phytologist**. 2007. v. 175 p. 340–350. 2007. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2007.02105.x/epdf>>. Acesso em 01 jun. 2017.
- BALLINI, E. et. al. A Genome-Wide Meta-Analysis of Rice Blast Resistance Genes and Quantitative Trait Loci Provides New Insights into Partial and Complete Resistance. **Molecular Plant-Microbe interactions**. v. 21, n. 7, p. 859–868. jul. 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-7-0859>> Acesso em 02 jun. 2017
- BORBA, T. C. et. al. Microsatellite marker-mediated analysis of the Embrapa rice core collection genetic diversity. **Genetica**, v. 137, p.293-304, 2009.

BRADBURY, L.M.T. et al. A Perfect Marker for Fragrance Genotyping in Rice. **Molecular Breeding**. v. 16, n. 4, p. 279–283. nov. 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11032-005-0776-y>>. Acesso em 10 jun. 2017.

CHIN, J. H. et al. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake 1. **Theoretical Applied Genetics** v. 120. p.1073–1086. abr. 2010. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00122-009-1235-7>. Acesso em 01 jun. 2017.

CHIN, J. H. et al. Developing Rice with High Yield under Phosphorus Deficiency: Pup1 Sequence to Application. **Plant Physiology**. v. 156, p. 1202–1216.,jul. 2011. Disponível em: < <http://www.plantphysiol.org/content/156/3/1202.long>. Acesso em 01 jun. 2017.

CHEN, X. et al., Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and applied genetics**. v. 95, p. 553-567. 1997.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v.12, p. 13-15. 1990

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p.

GOUDA, P.K. et. al. Marker-assisted breeding of Pi-1 and Piz-5 genes imparting resistance to rice blast in PRR78, restorer line of Pusa RH-10 Basmati rice hybrid. **Plant Breeding**. v. 132, p. 61–69, 2013.

SUH, J. P. et al., The Pi40 gene for durable resistance to rice blast and molecular analysis of Pi40-advanced backcross breeding lines. **Phytopathology**. v. 99, p. 243-250, 2009.

VALDISSER P. A. M. R. et al. Protocolo de extração de DNA e genotipagem de SSRs em larga escala para uso no melhoramento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Comunicado Técnico 208**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013, 6 p. Disponível em: <file:///D:/Arquivos%20de%20Usuario/Downloads/comunicadotecnico-208.pdf>. Acesso em 03 jun. 2017.

XIN Z, et al. High-throughput DNA extraction method suitable for PCR. **Biotechniques** v. 34, p. 820-826.abr. 2003.