

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS ENTRE GENÓTIPOS DE ARROZ PARA USO EM SELEÇÃO ASSISTIDA

Danielle Costenaro da Silva¹; Danielly Lima².

Palavras-chave: Seleção assistida, polimorfismo molecular, arroz vermelho,

INTRODUÇÃO

A produtividade média do arroz teve um significativo crescimento na lavoura orizícola do Rio Grande do Sul (RS) nos últimos anos. Porém, cabe salientar que o potencial de rendimento de grãos das cultivares de arroz disponíveis para o cultivo não é atingido plenamente pelos orizicultores. Esta situação, em parte, pode ser atribuída à presença do arroz vermelho que é considerado a espécie mais problemática na orizicultura do sul do Brasil. Neste sentido, o programa de melhoramento genético do IRGA realiza trabalhos para o desenvolvimento de cultivares de arroz irrigado tolerantes a herbicidas do grupo químico das Imidazolinonas, para o cultivo no sistema de produção Clearfield®.

A cultivar IRGA 424 é atualmente recomendada para cultivo no RS, principalmente pela adaptação e potencial de rendimento de grãos. Assim, a conversão desta cultivar para o sistema de produção Clearfield® visa oferecer aos agricultores uma alternativa viável e eficaz no controle do arroz vermelho.

A seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) em arroz vem sendo utilizada na piramidização de genes de resistência à ferrugem bacteriana (HUANG et al., 1997), para melhorar características morfológicas das raízes e, assim, tolerância à seca (STEELE et al., 2005), melhorar o rendimento de variedades através de melhoramento assistido, e obtenção de linhagens através de retrocruzamento com alto potencial de rendimento (LIANG et al., 2004). Diversas classes estão disponíveis, porém os marcadores do tipo microssatélite ou SSR (Simple Sequence Repeats) são considerados ideais, já que são codominantes, abundantes, multialélicos e altamente polimórficos.

Este trabalho teve por objetivo foi identificar o polimorfismo entre as cultivares IRGA 424 (genótipo recorrente - GR) e Puitá Inta CL (genótipo doador - GD). Os marcadores polimórficos serão testados posteriormente na população proveniente deste cruzamento, buscando identificar os indivíduos que apresentam uma maior proporção do genoma recorrente. O uso de marcadores moleculares poderá ser útil, reduzindo assim o número de gerações de retrocruzamentos necessárias para o desenvolvimento de uma nova cultivar CL.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de arroz dos genótipos IRGA 424 e Puitá Inta CL foram submetidos à germinação em câmara de crescimento (BOD) a 25°C. O DNA de folhas jovens foi extraído de acordo com o protocolo de Haberer et al. (1996) com modificações. Onde, aproximadamente 50 mg de tecido de cada planta foi macerado em nitrogênio líquido e adicionado em 650 µL de tampão de extração (1M Tris pH 8.0, 0,5M EDTA, pH 8.0, 5 M NaCl, 2% CTAB e 1% PVP) submetido a 65°C por 30 minutos. Depois de finalizada as etapas da extração, o DNA foi diluído em tampão TE estéril e quantificado em espectrofotômetro.

Para as análises de SSR, foram realizadas reações de amplificação utilizando as seguintes concentrações finais em um volume de 15 µL: DNA genômico (25 ng/ µL), tampão de reação (1mM), MgCl₂ (0,6mM), dNTPs (0,15mM), *primer* (0,3µM), Taq DNA polimerase

¹ Doutora em Biologia Celular e Molecular, Instituto Rio Grandense do Arroz, Av. Bonifácio Carvalho Bernardes 1494, Cachoeirinha/RS, e-mail: danicostenaro@gmail.com.

² Graduanda em Ciências Biológicas (Unisinós), IRGA, e-mail: danylima-bio@hotmail.com.

(0,5U). As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador PT-100 da MJ-Research com o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55 a 65°C por 1 minuto (de acordo com a temperatura de anelamento de cada *primer*), 72°C por 2 minutos; e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Foram testados 84 SSR previamente mapeados e amplamente distribuídos no genoma arroz. Os produtos das ampliações foram resolvidos em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. O DNA dos genitores foi avaliado quanto à presença e ausência de bandas de SSR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 84 SSR avaliados somente 23% foram polimórficos entre as cultivares IRGA 424 e Puitá Inta CL. Apesar do baixo nível de polimorfismo detectado cabe salientar que os 19 marcadores polimórficos representaram 10 dos 12 cromossomos da espécie (Tabela 1).

Tabela 1 – SSR polimórficos entre os genótipos IRGA 424 e Puitá Inta CL e a identificação do cromossomo dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) no genoma do arroz.

<i>Primers</i> SSR	Cromossomo	<i>Primers</i> SSR	Cromossomo
RM495	1	RM161	5
RM431	1	RM3125	6
RM341	2	RM527	6
RM561	2	RM25	8
RM207	2	RM219	9
RM154	2	RM242	9
RM227	3	RM171	10
RM335	4	RM484	10
RM241	4	RM101	12
RM178	5		

A cultivar doadora Puitá Inta CL é essencialmente derivada da cultivar IRGA 417 (LIVORE et al., 2007). Assim, o baixo nível de polimorfismo encontrado pode ser explicado pelo fato dos genótipos utilizados serem muito próximos geneticamente.

O uso de marcadores moleculares como ferramenta para a recuperação do genótipo da cultivar recorrente requer o uso de um número significativo de marcadores, além de apresentarem uma boa distribuição ao longo de todo o genoma da espécie. Como exemplo, verifica-se na Tabela 1 que dos 19 marcadores polimórficos, quatro (RM341, RM561, RM207 e RM154) encontram-se no cromossomo dois e somente um marcador (RM227) no cromossomo três. Estes resultados indicam que um maior número de marcadores SSR deve ser prospectado para aumentar o número e a distribuição destes entre a cultivar IRGA 424 e a Puitá Inta CL.

O laboratório de Biotecnologia do IRGA está sendo estruturado para atender a demanda de pesquisa da Equipe de Melhoramento, sendo uma importante ferramenta para a SAMM em arroz irrigado. O trabalho aqui apresentado representa uma das primeiras demandas do programa, o qual está em fase inicial e com resultados ainda preliminares.

CONCLUSÃO

Foi possível verificar polimorfismo utilizando marcadores SSR entre as cultivares testadas. No entanto, o polimorfismo existente é baixo, o que indica que a amostragem de marcadores SSR deve ser aumentada.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HABERER, G.; FISCHER, T. C.; TORRES-RUIZ, R. A. Mapping of the Nucleolus Organizer Region on Chromosome 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, v. 250, n.1, p.123-128, 1996.
- HUANG, N.; ANGELES, E.R.; DOMINGO, J. et al. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor. Appl. Genet.* 95:313–320, 1997.
- LIANG, F.S.; DENG, Q.Y.; WANG, Y.G. et al. Molecular marker-assisted selection for yield-enhancing genes in the progeny of "9311 x *O. rufipogon*" using SSR. *Euphytica* 139:159–165, 2004.
- LIVORE, A.B.; PRINA, A.R.; BIRK, I. et al. PUITÁ INTA-CL, an imidazolinone resistant high yielding variety. 4th International Temperate Rice Conference, Proceedings... 2007.
- STEELE, K.A.; PRICE, A.H.; SHASHIDHAR, H.E. et al. Marker-assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. *Theor Appl Genet* 112:208-221, 2005.