

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO TIPO SNP EM POPULAÇÃO SEGREGANTE PARA O MAPEAMENTO DE QTL RELACIONADOS A ZINCO E FERRO EM ARROZ

SNP POLYMORPHISM IDENTIFICATION IN SEGREGATING POPULATION FOR QTL MAPPING ASSOCIATED WITH IRON AND ZINC IN RICE

Tereza Cristina de Oliveira Borba¹, Raquel Neves de Mello², Péricles Carvalho Neves³, Priscila Zaczuk Bassinello⁴, Ivã Matsushige⁵

¹Pesquisadora em Biologia Avançada, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, km 12, Zona Rural, Santo Antônio de Goiás - GO, 75375-000, tereza.borba@embrapa.br

²Pesquisadora em fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, km 12, Zona Rural, Santo Antônio de Goiás - GO, 75375-000, raquel.mello@embrapa.br

³Pesquisador em melhoramento de arroz, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, km 12, Zona Rural, Santo Antônio de Goiás - GO, 75375-000, pericles.neves@embrapa.br

⁴Pesquisadora em ciência de alimentos, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, km 12, Zona Rural, Santo Antônio de Goiás - GO, 75375-000, priscila.bassinello@embrapa.br

⁵Analista, Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462, km 12, Zona Rural, Santo Antônio de Goiás - GO, 75375-000, ivan.matsushige@embrapa.br

RESUMO - O conhecimento de fatores modificadores dos teores de ferro e zinco podem auxiliar os programas de melhoramento no desenvolvimento de linhagens biofortificadas. O mapeamento de QTL pode ser considerado uma importante ferramenta na elucidação da base genética de caracteres importantes ao melhoramento de plantas. O objetivo deste trabalho foi a avaliação do polimorfismo entre os genótipos Zebu Ligeiro e Chatão Branco, parentais de uma população biparental. A metodologia selecionada para a genotipagem foi o GBS, considerando-se somente os SNP com frequências superiores a 0,05. Um total de 18.511 marcadores SNP foi identificado, estes representaram cerca de 6% dos dados originais (derivados de um total de 600 acessos).

Palavras-chave: Marcadores moleculares, Arroz, micronutrientes

ABSTRACT - The knowledge of aspects related to iron and zinc content may furnish plant breeding programs with essential data for the development of biofortified cultivars. QTL mapping may be presented as a powerful approach to elucidate the genetic basis of economically important traits in plants. The objectives of this research were to evaluate the molecular polymorphism within Zebu Ligeiro and Chatão Branco, the parents of a rice mapping population. The analysis strategy for SNP identification favored the SNP with higher frequencies than 0.05. A total of 18,511 SNP markers were identified through GBS, representing, approximately, 6% of the original data (600 accessions).

Keywords: Molecular Markers, Rice, micronutrients

INTRODUÇÃO

Os micronutrientes são considerados componentes de extrema importância na composição nutricional de um alimento. Esta importância se torna ainda mais evidente em países em desenvolvimento. Esses elementos são identificados como micronutrientes por estarem presentes em concentrações mínimas em alimentos e, apesar de suas concentrações aparentemente ínfimas, são essenciais à manutenção da saúde humana. Logo, incrementos expressivos na concentração de micronutrientes em culturas utilizadas como fonte de alimento podem se tornar uma importante estratégia para melhorias na nutrição e saúde humanas (Uauy et al., 2006).

Considera-se que a combinação do arroz (*Oryza sativa* L.) com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é bastante completa em termos nutricionais, pois agrega a presença do amido, como fonte de energia, do ferro, de proteínas além de outros micronutrientes (Bassinello et al., 2012). Dessa maneira, essas culturas poderiam ser alvo de ações dentro de programas de melhoramento, objetivando-se aumentos significativos nas concentrações de micronutrientes. Porém, as duas culturas apresentam diferentes papéis no agronegócio mundial, necessitando de diferentes

estratégias para a exploração da diversidade genética disponível, diferentes métodos de melhoramento clássico e abordagens moleculares, assim como medidas socioeconômicas diferenciadas para cada uma das culturas.

Como o sequenciamento do genoma do arroz já foi realizado, é possível o desenvolvimento de um número quase ilimitado de marcadores baseados em DNA, que podem ser aplicados em caracterização varietal, construção de mapas de ligação, análise de QTL (Quantitative Trait Loci) e mapeamento associativo, permitindo, assim, um acúmulo de informações detalhadas sobre a estrutura e funcionamento de genes relacionados a caracteres de interesse (Xu et al., 2004).

MÉTODOS

Material vegetal e dados genotípicos

O DNA genômico dos parentais (Zebu Ligeiro e Chatão Branco) foi obtido a partir de folhas jovens, utilizando-se kit comercial DNeasy 96 Plant Kit (QIAGEN). Para a genotipagem em larga escala de SNP, utilizou-se a tecnologia de sequenciamento de nova geração denominada de genotipagem por sequenciamento (GBS, Genotyping by sequencing). O DNA genômico foi analisado pelo Instituto de Diversidade Genômica da Universidade de Cornell (Buckler Laboratory). Nesse instituto foram construídas as bibliotecas genômicas e conduzido o resequenciamento dos indivíduos.

A coleta de dados foi realizada em uma plataforma Genome Analyzer II (Illumina) e o sequenciamento foi do tipo single-end com plexagem de 96 amostras. As bibliotecas foram preparadas e analisadas de acordo com Elshire et al. (2011), utilizando-se a enzima de restrição “APK1” para digestão e desenvolvimento da biblioteca com barcodes únicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parentais Zebu Ligeiro e Chatão Branco foram analisados concomitantemente a um conjunto de 600 genótipos de arroz, obtendo-se, ao final, 516.240 SNP distribuídos nos 12 cromossomos de arroz. Esses SNP foram identificados, após uma filtragem inicial, utilizando uma frequência mínima alélica (FMA) de 0,01. Porém, tendo em vista a eliminação de alelos raros e uma maior confiabilidade dos dados, os marcadores foram mais uma vez filtrados com FMA de 0,05, obtendo-se assim um total de 285.379 SNP. Após a filtragem dos dados referentes somente aos dois parentais, obtiveram-se 18.511 SNP polimórficos distribuídos ao longo dos 12 cromossomos do arroz (Tabela 1), os quais representaram aproximadamente 6% do total de marcadores identificados (após filtragem com FMA de 0,05).

O cromossomo 1 apresentou o maior número de SNP, com 2.915, representando aproximadamente 16% do número total de marcadores identificados para esses parentais. Dentre as substituições identificadas, a mais comum foi T/C ou C/T, com um total de 5.578 marcadores (Tabela 2). A partir destas informações estima-se que esses marcadores representarão uma importante ferramenta no desenho do mapa genético e posterior identificação de QTL relacionados aos teores de Fe e Zn para a população segregante derivada do cruzamento Zebu x Chatão.

Tabela 1. Número de marcadores do tipo SNP identificados em cada cromossomo da cultura do arroz para os parentais Zebu Ligeiro e Chatão Branco.

Cromossomo	Nº de marcadores SNP
1	2.915
2	1.439
3	2.112
4	913
5	1.045
6	1.879
7	819
8	1.304
9	426
10	2.202
11	1.657
12	1.800
Total	18.511

Tabela 2. SNP identificados e sua abundância para os parentais Zebu Ligeiro e Chatão Branco.

Substituição	Nº de marcadores SNP
A/C – C/A	2.162
A/G – G/A	5.466
A/T – T/A	1.166
C/G – G/C	1.987
C/T – T/C	5.578
G/T – G/T	2.163
Total	18.511

CONCLUSÃO

Verificou-se a presença de polimorfismo considerável entre os dois genótipos utilizados como parentais para a população segregante a ser utilizada no mapeamento de regiões relacionadas aos teores de Fe e Zn. O mapa saturado certamente potencializará a identificação destas regiões.

REFERÊNCIAS

BASSINELLO PZ; CARVALHO RN; ARAÚJO MR; ALMEIDA RP; COBUCCI RMA. Potencial de Aproveitamento de Farinhas de Quirera de Arroz e Bandinha de Feijão em Biscoitos Tipo Cookie. Comunicado Técnico, 204. 2012. 8 p.

ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K. et al. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. PLoS ONE, 2011.

UAUY C; DISTELFELD ;FAHIMA T;BLECHL A; DUBCOVSKY J. A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. Science, 314, n. 5803, 1298-1301, 2006.

XU, Y. B.; BEACHELL, H.; MCCOUCH, S. R. A marker-based approach to broadening the genetic base of rice in the USA. Crop Science, Madison, v. 44, n. 6, p. 1947-1959, 2004.