

Identificação e validação de marcadores moleculares associados a regiões que explicam variações no teor de amido e temperatura de gelatinização em grãos de arroz.

OLIVEIRA, Leciane Karita; **BRONDANI**, Claudio; **BORBA**, Tereza Cristina de Oliveira; **BRONDANI**, Rosana Pereira Vianello.

Universidade Federal de Goiás-Embrapa Arroz e Feijão

lecianeoliveira@hotmail.com

Palavras chave: marcadores moleculares, amido, teor de amilose, temperatura de gelatinização.

Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma importante fonte de nutrientes na dieta de mais da metade da população mundial. Tradicionalmente ele tem sido plantado no Brasil em dois ambientes: várzeas, onde é plantado em áreas naturalmente inundadas e terras altas, onde é cultivado em terras firmes sem irrigação. Novas variedades de arroz, com potencial elevado de rendimento e com alta qualidade, são produzidas com o intuito de atender a crescente demanda da população, e buscando também atender a preferência do consumidor às características antes e após o cozimento. Estes fatores têm grande influência na produção e consumo do arroz, e variam bastante de acordo com cada região. Sendo assim, é fundamental que os melhoristas desenvolvam cultivares com diversidade na qualidade do grão para satisfazer a procura do consumidor (Liu et al.2004).

A qualidade do grão de arroz é influenciada principalmente por propriedades físico-químicas do amido, uma vez que este compreende 90% do total de matéria seca (Bao et al.2008). O amido é um polímero formado por dois tipos de glicose, a amilose que é formada por cadeia linear, e amilopectina formada por cadeia ramificada. O teor de amilose e a temperatura de gelatinização estão entre os parâmetros mais importantes destas propriedades do grão. Estudos genéticos têm aumentado bastante a compreensão da base genética destes dois parâmetros. Já se sabe que o gene *Wx*, que codifica a enzima grânulo bound starch syntase (GBSS), é responsável pelo teor de amilose, enquanto que o gene *SSIIa* que codifica a enzima *starch syntase* (SS2.a), é responsável pela temperatura de gelatinização. Outros genes relacionados a estes parâmetros são *SSI* que também codifica a enzima *starch syntase*, *Sbe1* e *Sbe3* que codificam as enzimas *starch branching 1 e 3* (Bao et al., 2008).

A busca por variedades e linhagens que possuem diferentes características de qualidade de grãos pode ser feita em um bancos de germoplasma de arroz. Os diferentes acessos presentes nestes bancos, representando diferentes espécies, linhagens e cultivares, apresentam ampla variabilidade e podem ser avaliados quanto às características dos grãos. Coleções nucleares são estabelecidas com o intuito de amostrar a variabilidade do banco de germoplasma em um número reduzido de acessos, com o mínimo de redundância. O conhecimento dos genes responsáveis pela qualidade do grão facilita a dissecação dessas características nos acessos avaliados pois permite uma associação direta entre o polimorfismo presente nos genes e o fenótipo de

cada acesso, utilizando o desequilíbrio de ligação existente. O desequilíbrio de ligação consiste na associação não aleatória entre dois marcadores no genoma ou entre um gene e um marcador, sendo a base para o mapeamento associativo.

Este trabalho tem como objetivo identificar e validar a associação entre marcadores moleculares baseados em marcadores moleculares microssatélites e SNPs e regiões genômicas envolvidas em rotas metabólicas que possibilitam detectar variação no teor de amido e temperatura de gelatinização em grãos de arroz.

Metodologia

Para realização do trabalho foram utilizados 242 acessos de cultivares e linhagens da coleção nuclear de arroz da Embrapa Arroz e Feijão. Para avaliação das características do grão, foi realizada análise de temperatura de gelatinização e de teor de amilose utilizando. Foi utilizado também análise sensorial de todos os acessos avaliando as características consideradas mais importantes após o cozimento do cereal como, pegajosidade, textura e rendimento.

Para análise genômica, a extração de DNA foi realizada utilizando folhas. Para amplificação dos fragmentos foram utilizados marcadores STS, CAPS, SSR e SNP descritos por Bao et al (2006a), SNPs descrito por Bao et al (2006c), e marcadores SSR e SNPs desenvolvidos no laboratório de biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão (Tabela1). Dos marcadores utilizados 9 são microssatélites e foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, 2 SNPs foram detectados com CAPS utilizando as enzimas de restrição *AccI* e *SpeI*, com visualização dos fragmentos em gel de agarose 3%. E para 26 SNPs a análise foi realizada baseada na sequência, a partir de um sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Quatro primers foram combinados de diferentes formas para detectar o polimorfismo na região do gene *SSIIa*, e um marcador STS foi utilizado para detectar SNP no gene *SSIIa* (tabela1).

Através de consulta no banco de dados de arroz, foi possível encontrar sequências expressas do genoma do arroz que, possibilitaram a construção de primers explorando toda rota do amido. Estes primers foram desenhados flanqueando sequências ricas em regiões repetivas ou SNP's, utilizando o software Primer3.

Foi utilizado o programa Tassel para análise de associação entre os dados fenotípicos do grão e dados moleculares. Para análise de qualidade das sequências geradas foi utilizado o programa phred, o alinhamento das sequências foi executado pelo programa ClustalX, a detecção dos SNPs foi realizado pelo programa *Staden Package*.

Tabela1-Marcadores moleculares utilizados na análise molecular

Marcador Molecular	Característica	Gene	Tipo	Deteção	Referência
RM190	TA	<i>Wx</i>	SSR	poliacrilamida	Ayres et al.1997
RM197	TA-TG	<i>SBE1</i>	SSR	poliacrilamida	Bao et al. 2002b
OS21	TA-TG	<i>SS1</i>	SSR	poliacrilamida	Akagi et al. 2003
W2R	TA-TG	<i>Wx</i>	SNP+CAPS	enz.restrição	Ayres et al.1997
SBE3	TA-TG	<i>SBE3</i>	SNP+CAPS	enz.restrição	Han et al.2004
SBE1	TA-TG	<i>SBE1</i>	STS	agarose	Han et al.2005
F7/R1	TG	<i>SSIIa</i>	SNP	agarose	Bao et al. 2006
F7-F22/R1	TG	<i>SSIIa</i>	SNP	agarose	Bao et al. 2007
F7/R1-R21	TG	<i>SSIIa</i>	SNP	agarose	Bao et al. 2008
F7-F22/R1-R21	TG	<i>SSIIa</i>	SNP	agarose	Bao et al. 2009
SS3s	TA-TG	soluble starch synthase 3	SSR	poliacrilamida	cnpaf 2007
SS1s	TA-TG	<i>SS1</i>	SSR	poliacrilamida	cnpaf 2007
GL3s	TA-TG	glucose-1-phosphate adenyltransferase	SSR	poliacrilamida	cnpaf 2007
SS2.1s	TA-TG	<i>SSII-1</i>	SSR	poliacrilamida	cnpaf 2007
GL1s	TA-TG	glucose-1-phosphate adenyltransferase	SSR	poliacrilamida	cnpaf 2007
GB1s	TA-TG	<i>Wx</i>	SSR	poliacrilamida	cnpaf 2007
SS2.1	TA-TG	<i>SSII-1</i>	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GGP	TA-TG	glycogen synthase 2	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GL3	TA-TG	glucose-1-phosphate adenyltransferase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GS2	TA-TG	glycogen synthase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GG2	TA-TG	glucose-1-phosphate adenyltransferase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
CA	TA-TG	Glucose-6-phosphate isomerase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
SS1	TA-TG	<i>SS1</i>	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
AG	TA-TG	<i>SBE1</i>	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GGA	TA-TG	glycogen synthase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GB1	TA-TG	<i>Wx</i>	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GPG	TA-TG	Glucose-6-phosphate isomerase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GGT	TA-TG	starch synthase III granule-bound starch synthase 1b	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GB1b	TA-TG	starch synthase III granule-bound starch synthase 1b	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
SS2.2	TA-TG	<i>SSII2</i>	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GPI	TA-TG	Glucose-6-phosphate isomerase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GSG	TA-TG	glucose-1-phosphate adenyltransferase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GSG.2	TA-TG	Glucose-1-phosphate adenyltransferase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
SS2.3	TA-TG	<i>SSIIa</i>	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
SS3	TA-TG	soluble starch synthase 3	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
CB	TA-TG	Glucose-6-phosphate isomerase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
PGE	TA-TG	phosphoglucomutase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007
GG	TA-TG	glucose-1-phosphate adenyltransferase	SNP	sequenciamento	cnpaf 2007

Resultados e Discussão

Os marcadores moleculares desenhados para este trabalho no laboratório de biotecnologia apresentaram sucesso na amplificação da PCR, apresentando bandas fortes e bem definidas, todos apresentaram polimorfismo, o marcador SS3s apresentou 4 alelos, SS1s 9 alelos, GB1s 11 alelos, GL3s 18 alelos e GL1s 15 alelos. Para os marcadores SNP que foram desenhados para o sequenciamento, apenas 3 ainda não tiveram boa amplificação, e para os SNPs amplificados todos apresentaram os SNPs esperados baseados nas sequencias de referência.

Os resultados do sequenciamento dos fragmentos dos diferentes genótipos permitiram a identificação dos SNPs através do alinhamento das sequencias para cada marcador separadamente através do programa ClustalX. A identificação dos SNPs foram realizadas visualmente, porém em análise futura a confirmação e identificação de possíveis SNPs será realizada pelo programa *Staden Package*, proporcionando assim maior confiabilidade dos dados.

Como resultados preliminares, foi realizado análise de associação utilizando o programa Tassel para os 242 acessos. Para esta análise foi utilizado o parâmetro GLM, para os dados gerados com os marcadores SSR, STS e SNPs detectados através das enzimas de restrição, juntamente com os dados genotípicos foi adicionado os dados fenotípicos de TA e TG, e dados de estruturação populacional. Para esta análise observou-se que dentre os marcadores avaliados foi encontrado três marcadores, RM190, W2R, GB1s, que estão aparentemente associados ao teor de amilose. Estes mantiveram a associação para os dois anos de avaliação de TA (Tabela2).

Tabela 2- Resultado da análise de associação para 242 indivíduos utilizando o programa Tassel, onde os marcadores destacados tiveram associação com as características avaliadas.

Característica	Marcadores	p-valor	Coefficiente de determinação (R ²)
TA04	SBE1	1	0,0027
TA04	RM197	0,9999	0,0235
TA04	OSR21	1	0,0162
TA04	SS3s	1	0,0194
TA04	SS1s	0,989	0,0513
TA04	GB1s	1,00E-04	0,1918
TA04	F7F22R1R21	0,993	0,0129
TA04	W2R	0,0000	0,0517
TA04	SBE3	0,6706	0,0214
TA05	SBE1	0,9971	0,0117
TA05	RM197	0,0751	0,0604
TA05	OSR21	0,7707	0,0495
TA05	SS3s	1	0,0195
TA05	SS1s	0,8168	0,0594
TA05	GB1s	1,00E-04	0,1773
TA05	F7F22R1R21	1	0,0074
TA05	W2R	0,0000	0,0404
TA05	SBE3	0,2393	0,0279
TG07	SBE1	0,6388	0,0209
TG07	RM190	0,3558	0,0871
TG07	RM197	0,9692	0,0308
TG07	OSR21	0,5793	0,0532
TG07	SS3s	1	0,0139
TG07	SS1s	0,5208	0,0653
TG07	GB1s	1	0,0468
TG07	F7F22R1R21	1	0,0034
TG07	W2R	0,9753	0,0138
TG07	SBE3	1	0,0019

De acordo com Bao et al (2006c), os marcadores RM190 e W2R têm grande associação com teor de amilose, corroborando os resultados encontrados. Porém este autor sugere que estes marcadores juntos podem explicar mais de 80% da variação do teor de amilose, enquanto que os dados deste trabalho explicam 22% e 5,3% respectivamente, diferença esta que pode ser explicada pela diversidade genética encontrada em cada população. A população utilizada em Bao et al (2006c) apresentava menor diversidade genética que a utilizada no presente trabalho, o que sugere que quanto maior a diversidade genética da população analisada menor o poder de explicação do marcador, sendo que, no entanto, a estimativa da contribuição de tal marcador para a análise é mais robusta (Chen et al, 2008). Os três marcadores associados estão presentes no gene que participa da síntese da enzima *granule bound starch synthase* (GBSS), a qual controla a síntese da amilose.

Conclusões

Pode ser concluído que os marcadores RM190, W2R e GB1s apresentam associação com teor de amilose, explicando de 5.3 a 22% da variação encontrada.

O gene *Waxy* influencia diretamente no teor de amilose.

O resultado deste trabalho juntamente com estudos anteriores, demonstra que o marcador RM190 está estreitamente relacionado ao teor de amilose.

Referências Bibliográficas

- Chen, M.H.; Bergman, C.; Pinson, S.; Fjellstrom, R. *Waxy* gene haplotypes: Associations with apparent amylose content and the effect by the environment in international rice germplasm collection. *Journal of Cereal Science*. 47, p. 536–545, 2008.
- J.S. BAO; H. CORKE; M. SUN. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.) *Theor Appl Genet*. v.113, p.1185–1196, 2006a.
- J. S. BAO; H. CORKE; M. SUN Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor Appl Genet* v.113, p.1171, June 2006c.
- J. BAO; L. JIN; P. XIAO, S SHEN, M. SUN, H. CORKE Starch Physicochemical Properties and Their Associations with Microsatellite Alleles of Starch-Synthesizing Genes in a Rice RIL Population *J. Agric. Food Chem.* v. 56, p. 1589–1594. J. 2008.
- Liu X, Gu M, Han Y, Ji Q, Lu J, Gu S, Zahang R, Li X, Chen J. Developing gene-tagged molecular markers for functional analysis of starch-synthesizing genes in rice (*Oryza sativa* L.) *Euphytica* v. 135p. 345-353. N. 2004.