

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UM PAINEL DE ARROZ: A BASE DO MAPEAMENTO ASSOCIATIVO

LUCIANA DALLEGRAVE SCHROEDER¹; MATHEUS KUNRATH MEYER²;
EDUARDO VENSKE²; VÍVIAN EBELING VIANA², ANTONIO COSTA DE
OLIVEIRA², CAMILA PEGORARO³

¹Universidade Federal de Pelotas – luciana.biotechnologia@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – 96meyer@gmail.com; eduardo.venske@yahoo.com.br;
vih.viana@gmail.com; acostol@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Com uma produção total de 715 milhões de toneladas, em uma área de 160 milhões de hectares, o arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado um dos cereais mais importantes do mundo e serve como alimento para 3,5 bilhões de pessoas (revisado por PANDIT et al. 2017). Culturas associadas à segurança alimentar como o arroz são mais baratas, e por isso compõem a maior parte da dieta em países emergentes (DUBOCK, 2017). No entanto, não há como saber se haverá arroz disponível para atender a demanda de uma população em constante crescimento. E a situação se agravada ainda mais pelo impacto negativo das mudanças climáticas sobre a produtividade. Aliado a esse cenário de incerteza está a deficiência de nutrientes, um problema que já afeta mais de dois bilhões de pessoas nos países em desenvolvimento (revisado por SWAMY et al. 2016).

Para resolver essa situação é necessário que melhoristas de plantas trabalhem no desenvolvimento de genótipos de arroz mais produtivos, tolerantes a estresses ambientais e com melhor qualidade nutricional. Porém, esses caracteres são de seleção complexa, pois são controlados por muitos genes, localizados em locos de caracteres quantitativos (QTLs), e são muito influenciados por fatores ambientais (COLLINS et al. 2018; DU et al. 2013; HUANG et al. 2014).

O entendimento da base genética/molecular que controla caracteres quantitativos é pré-requisito para a aplicação de abordagens genômicas para auxiliar o processo de melhoramento. O mapeamento genético em plantas pode ser desenvolvido utilizando duas estratégias, o mapeamento de ligação e o mapeamento associativo. O mapeamento de ligação depende da recombinação genética durante a construção de populações de mapeamento, no qual há uma resolução de mapeamento relativamente baixa e baixo número de alelos. Já o mapeamento associativo depende dos eventos de recombinação genética histórica acumulada durante muitas gerações, resultando em alta resolução de mapeamento e um grande número de alelos. Em ambos os casos é necessária a identificação de marcadores moleculares ligados a QTLs (revisado por XU et al. 2017). Marcadores SNPs (*single nucleotide polymorphism* - polimorfismo de nucleotídeo único) estão entre os marcadores moleculares utilizados em estudos de mapeamento.

Antes de fazer uma análise de mapeamento associativo é essencial determinar agrupamento da população (*population structure*) e a variabilidade genética dos acessos utilizados, de modo a reduzir erros de associação. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar a variabilidade genética de um painel de arroz composto por 94 acessos visando avaliar a sua utilização em estudos de mapeamento associativo.

2. METODOLOGIA

Um painel com 94 acessos de arroz (*Oryza sativa* L.) foi utilizado nesse estudo. Folhas de cada acesso foram submetidas à extração de DNA utilizando o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (DOYLE; DOYLE 1990). As amostras de DNA liofilizadas foram enviadas para o Laboratório de Serviços de Genotipagem do IRRI (*International Rice Research Institute* – Instituto Internacional de Investigação do Arroz) – Filipinas. Os 94 acessos de arroz foram genotipados com 7098 marcadores SNPs utilizando a plataforma de genotipagem 7K Infinium SNP (Illumina®).

Após análise de dados usando o programa TASSEL V.5.2.41 (BRADBURY et al 2007), foram removidos os acessos de arroz com taxa de chamada (*call rates*) < 75% (até 25% dos SNPs para aquele acesso não apresentavam leitura). Foram removidos SNPs com leitura em branco (*missing data*) > 20% (para o SNP permanecer na análise é necessário que esteja presente em no mínimo 80% dos acessos) e alelos de baixa frequência (*minor allele frequency*), neste caso $\leq 5\%$ (alelos que só apareciam até 5% no painel testado). Após filtragem, 93 acessos e 4973 SNPs de alta qualidade foram mantidos na análise.

A distância entre os acessos foi calculada através do método da identidade por estado (*identity by state* – IBS), recomendada para estudos de mapeamento associativo. Uma árvore filogenética foi obtida pelo método da ligação média entre grupos (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* - UPGMA). Ambas as análises foram feitas usando o programa TASSEL V.5.2.41. Os dados de distância foram convertidos em intensidade de cor, no qual cores mais intensas representam maiores distâncias entre os acessos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após calcular a distância genética de cada acesso em comparação aos demais se verificou que dentro do painel estudado há acessos geneticamente similares enquanto outros são geneticamente distantes, com uma distância média de 0,31 (Figura 1). Esse perfil genético era previsto, visto que ao selecionar os acessos de arroz buscou-se representar a base genética utilizada nas diferentes empresas de melhoramento de arroz da Região Sul do Brasil, e naturalmente observou-se que os acessos provenientes do mesmo programa de melhoramento são mais similares geneticamente. Esse estreitamento da variabilidade genética em acessos provenientes do mesmo programa já havia sido detectado por RAIMONDI et al. (2014), reforçando os resultados obtidos nesse estudo. Por outro lado, acessos provenientes de diferentes programas, assim como acessos desenvolvidos em outros países, que também compõem o painel, foram geneticamente mais distantes entre si.

A árvore filogenética separou os acessos em dois grupos principais. De maneira geral, um grupo foi formado por acessos da subespécie *japonica* e o outro por acessos da subespécie *indica* (Figura 2). Porém, acessos *japonica* foram encontrados no grupo *indica* e vice-versa. Esse comportamento pode ser explicado pela origem desses acessos, que possivelmente são provenientes do cruzamento de genótipos da subespécie *indica* com genótipos da subespécie *japonica*. Dentro dos grupos podem-se observar subgrupos, o que evidencia a presença de variabilidade genética entre os acessos de arroz estudados, requisito básico para análises de mapeamento associativo.

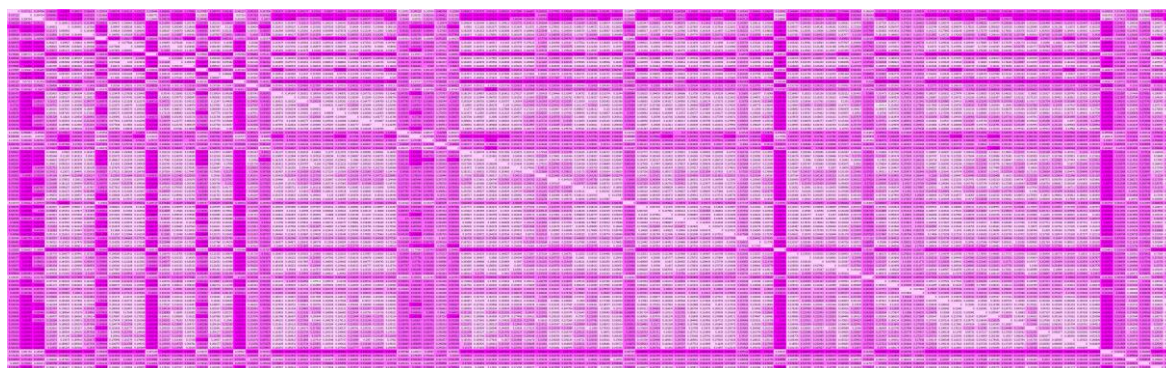


Figura 1. Distância genética entre 93 acessos de arroz (*Oryza sativa* L.). A distância genética varia de 0 a 1, sendo 0 os genótipos mais similares (rosa claro) e 1 os genótipos mais distantes (rosa escuro), assim o aumento da intensidade da cor representa um aumento da distância genética entre os genótipos.

A variabilidade genética observada nesse estudo pode ser utilizada na identificação de alelos superiores que controlam características agrônômicas e de qualidade por meio do mapeamento associativo. No mapeamento associativo baseado em desequilíbrio de ligação, associações não aleatórias entre locos e fenótipo em populações naturais são muito importantes para entender a base genética de características complexas (NACHIMUTHU et al. 2015).

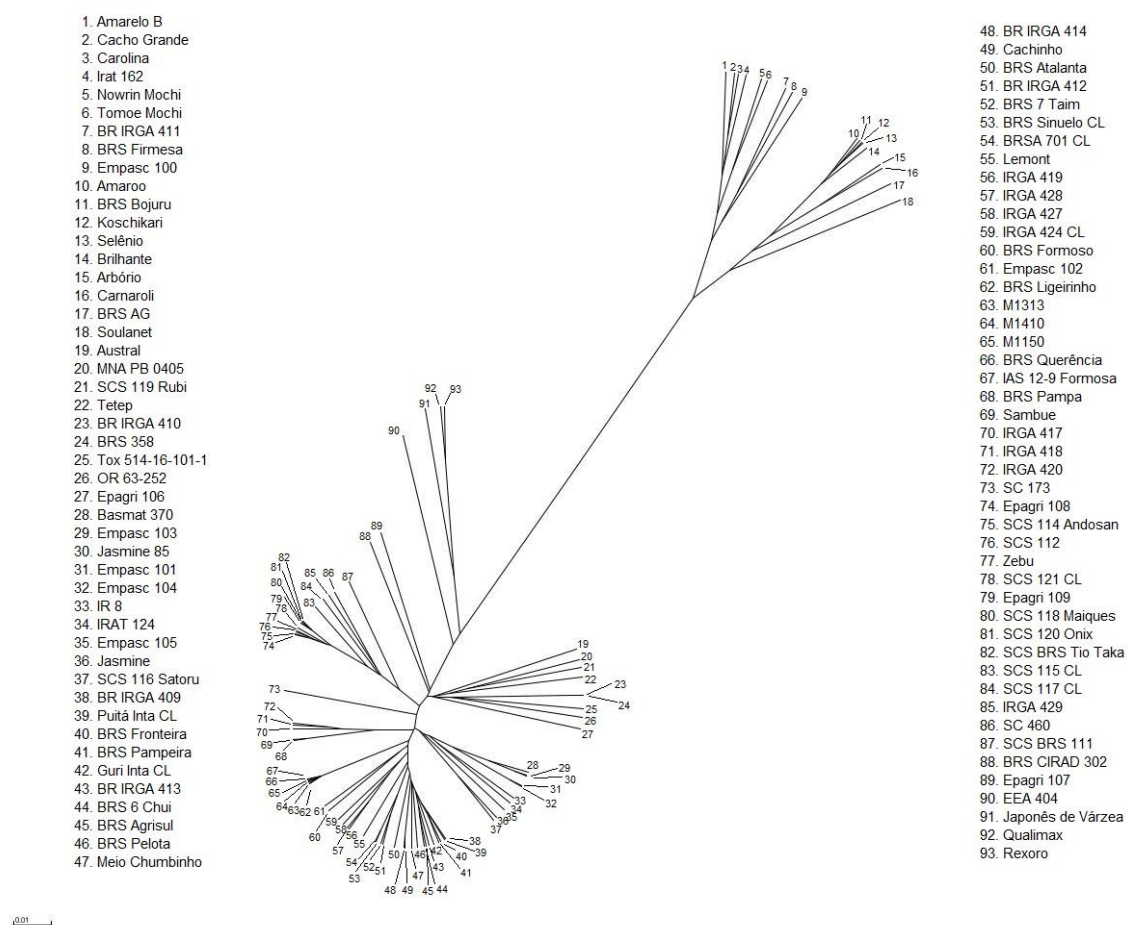


Figura 2. Árvore filogenética sem raiz obtida pelo método UPGMA em 93 acessos de arroz (*Oryza sativa* L.).

4. CONCLUSÕES

Considerando o padrão de variabilidade genética dos acessos sugere-se que o painel de arroz utilizado representa os genótipos que são cultivados na Região Sul do Brasil e permite a realização de estudos de associação genômica ampla para diferentes caracteres de importância agrônoma. Análises do desequilíbrio de ligação e do agrupamento da população estão sendo conduzidas para complementar os resultados obtidos nesse estudo.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro e bolsas de estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADBURY, P.J., ZHANG, Z., KROON, D.E., CASSTEVENS, T.M., RAMDOSS, Y., BUCKLER, E.S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, 23, p. 2633-2635, 2007.
- COLLINS, N.C., TARDIEU, F., TUBEROSA, R. Quantitative Trait Loci and Crop Performance under Abiotic Stress: Where Do We Stand? **Plant Physiology**, v.147, p.469-486, 2008.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- DU, J., ZENG, D., WANG, B., QIAN, Q., ZHENG, S., LING, H.Q. Environmental effects on mineral accumulation in rice grains and identification of ecological specific QTLs. **Environmental Geochemistry and Health**, v.35, p.161-170, 2013.
- DUBOCK, A. An overview of agriculture, nutrition and fortification, supplementation and biofortification: Golden Rice as an example for enhancing micronutrient intake. **Agriculture and Food Security**, 6:59, 2017.
- HUANG, A., XU, S., CAI, X. Whole-Genome Quantitative Trait Locus Mapping Reveals Major Role of Epistasis on Yield of Rice. **Plos One**, 9:87330, 2014.
- NACHIMUTHU, V.V., MUTHURAJAN, R., DURAIKALAGURAJA, S., SIVAKAMI, R., PANDIAN, A.A., PONNIAH, G., GUNASEKARAN, K., SWAMINATHAN, M., SUJI, K.K., SABARIAPPAN, R. Analysis of population structure and genetic diversity in rice germplasm using SSR markers: An initiative towards association mapping of agronomic traits in *Oryza sativa*. **Rice**, 8:30, 2015.
- PANDIT, E., TASLEEM, S., BARIK, S.R., MOHANTY, D.P., NAYAK, D.K., SHAKTI P. MOHANTY, SUJATA DAS, PRADHAN, S.K. Genome wide association mapping reveals multiple QTLs governing tolerance response for seedling stage chilling stress in indica rice. **Frontiers in Plant Science**, 8:552, 2017.
- RAIMONDI, J. V., MARSCHALEK, R., NODARI, R.O. Genetic base of paddy rice cultivars of Southern Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.14, p. 194-199, 2014.
- SWAMY, B.P.M., RAHMAN, M.A., INABANGAN-ASILO, M.A., AMPARADO, A., MANITO, C., CHADHA-MOHANTY, P., REINKE, R., SLAMET-LOEDIN, I.H. Advances in breeding for high grain Zinc in Rice. **Rice**, 9:49, 2016.
- XU, Y., LI, P., YANG, Z., XU, C. Genetic mapping of quantitative trait loci in crops. **The Crop Journal**, v.5, p.75-184, 2017.