

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE GOIÁS Uni-ANHANGUERA
CURSO DE AGRONOMIA**

**OTIMIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A
QTL DE RESISTÊNCIA À MANCHA PARDA E À QUEIMA DA
BAINHA EM ARROZ**

SANDY DA SILVA SOARES

GOIÂNIA
Novembro/2019

SANDY DA SILVA SOARES

**OTIMIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A
QTL DE RESISTÊNCIA À MANCHA PARDA E À QUEIMA DA
BAINHA EM ARROZ**

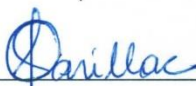
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Universitário de Goiás – Uni-ANHANGUERA, sob orientação da Professora Dra. Camila de Marillac Costa Nunes e coorientação da Pesquisadora Dra. Aluana Gonçalves Abreu, como requisito parcial para obtenção do título de bacharelado em Agronomia.

GOIÂNIA
Novembro/2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A QTL DE RESISTÊNCIA À MANCHA PARDA E À QUEIMA DA BAINHA EM ARROZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora como requisito parcial para obtenção do Bacharelado em Agronomia do Centro Universitário de Goiás - Uni-ANHANGUERA, defendido e aprovado em 25 de novembro de 2019 pela banca examinadora constituída por:



Prof^ª. Dra. Camila de Marillac Costa Nunes

Orientador(a)



Pesquisadora Dra. Aluana Gonçalves de Abreu

Coorientadora(a)/Membro



Prof^ª. Dra. Luciana Casaletti

Membro

Dedico este trabalho à minha amada e querida avó Lio (*in memorian*) pela mulher que foi e me inspira todos os dias a ser. Saudades dos abraços cancelados pela eternidade.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pelo dom da vida, pela saúde e oportunidade de colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho e abrir tantas portas durante essa etapa.

Aos meu pais Jorge e Elinaide pela confiança depositada em mim, pelo apoio, incentivo e por fazerem dos meus sonhos os seus. Juntamente a eles os meus queridos irmãos Matheus e George que sempre estiveram ao meu lado mesmo sem compreender os motivos de tudo isso. Muito obrigada meninos, cada pedacinho de mim carrega um pouco de vocês. Amo vocês.

Á Jaciane Nascimento e Breno Nunes pela amizade durante todo o tempo de graduação, pelos momentos de tristezas e alegrias compartilhadas, pelas conversas e principalmente por todo apoio durante esses cinco anos de caminhada.

Ao Carlinhos, Ricardo e Millene pela parceria e amizade durante o curso. Foram vocês que deixam os meus dias mais leves.

Á Laís Alves e Alessandra Gonçalves por serem amigas fieis, pelos conselhos, apoio e por todos os momentos que compartilhamos juntas. Vocês são presentes que a vida me deu.

À Lara, Bruna e Larissa pela amizade sincera e douradora, por acreditarem e sonharem junto comigo todos esses acontecimentos.

Ao Fabrício que passou a fazer parte desse sonho e que tem me incentivado a realizá-lo assim como todos os outros. Muito obrigada pelo carinho, apoio e companheirismo, você é um presente de Deus na minha vida.

Às minhas orientadoras Aluana Gonçalves e Camilla Marillac pela paciência, dedicação e apoio durante essa caminhada. Foram vocês que tornaram esse trabalho possível.

À Raquel Neves Mello, Tereza Cristina e todos os integrantes do Laboratório de Seleção Assistida. Em especial a Luana por sua disposição, sou grata por ter me dado todo o suporte e apoio sem medir nenhum esforço.

Ao CNPq por ter me concedido a bolsa de pesquisa.

À Embrapa Arroz e Feijão pela estrutura e suporte durante todo o período de desenvolvimento da pesquisa.

À todos vocês o meu muito obrigada.

“Onde as necessidades do mundo e os seus talentos se cruzam, aí está a sua vocação”.

Aristóteles

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa*) é o segundo cereal mais consumido no mundo, sendo a principal fonte de energia para mais da metade da população mundial. No Brasil, devido ao clima favorável, as principais doenças da cultura são de origem fúngicas. *Magnaphorte oryzae* é o agente causal da principal doença de arroz, a brusone, porém, doenças consideradas secundárias como a mancha parda (*Bipolaris oryzae*) e a queima da bainha (*Rhizoctonia solani*) já causam danos de níveis significativos nas lavouras. Assim, o objetivo do trabalho foi otimizar marcadores moleculares associados a QTL para resistência à mancha parda e queima da bainha em genótipos de arroz pertencentes ao BAG da Embrapa Arroz e Feijão. Foram identificados 26 marcadores SSR, previamente identificados na literatura, associados a QTL de resistência à essas doenças. Os marcadores foram testados em 27 genótipos contrastantes, ou seja, resistentes e suscetíveis. Para a otimização e posteriormente validação dos marcadores, foi feito teste de temperatura de anelamento dos primers e quantidade de reação para cada marcador. Após a extração de DNA, as amostras foram amplificadas através da PCR e a visualização das mesmas foi feita através da eletroforese em gel de agarose. Em relação ao processo de otimização, a temperatura de anelamento variou $\pm 4^{\circ}\text{C}$ em relação a temperatura descrita na literatura. Foram identificados sete marcadores monomórficos e 14 marcadores polimórficos, dos quais oito possuem até três alelos. Os marcadores polimórficos poderão ser utilizados na próxima etapa do trabalho que será verificar se existe associação dos alelos desses marcadores com resistência às doenças.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores microssatélites. Doenças secundárias. *Rhizoctonia solani*. *Bipolaris oryzae*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	02
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Aspectos gerais da cultura do arroz	3
2.2 Importância econômica de doenças fúngicas	4
2.3 Doenças da cultura do arroz	5
2.3.1 Mancha Parda	6
2.3.2 Queima da bainha	8
2.4 Estratégias de manejo para o controle de doenças fúngicas	9
2.5 Melhoramentos genético visando a resistência de doenças	11
2.6 Uso das ferramentas biotecnológicas no melhoramento genético	12
2.6.1 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)	13
2.6.2 Marcadores Microssatélites	14
2.7 Validação dos marcadores	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O arroz é o alimento básico para mais da metade da população mundial, sendo também a principal fonte de energia. É o segundo cereal mais produzido no mundo com 769,6 milhões de toneladas colhidas, instaladas em 167,2 milhões de hectares. A cultura é bastante suscetível ao ataque de patógenos que são os principais responsáveis pela redução na produtividade e qualidade de grãos (FAO, 2017).

No Brasil, devido ao clima favorável, as principais doenças que ocorrem nas lavouras orizícolas são de origem fúngica (BORÉM; RANGEL, 2015). A brusone tem se destacado como a principal doença da cultura do arroz, porém, doenças consideradas secundárias como a mancha-parda e a queima da bainha já causam danos econômicos consideráveis em várias regiões do país (SOSBAI, 2016).

Um dos métodos mais efetivos para o controle dessas doenças é o uso de variedades resistentes, obtidas através do melhoramento genético de plantas. A principal estratégia para o desenvolvimento de uma variedade resistente é através da seleção de genótipos superiores. Geralmente no melhoramento convencional, essa seleção é feita pelo melhorista através da sua capacidade de selecionar plantas que apresentam caracteres de interesse (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2019)

Com o surgimento da biotecnologia, a seleção de plantas com o auxílio de marcadores moleculares se tornou mais eficiente, pois, além de demandar menor tempo que na seleção convencional, não há influência ambiental. Os caracteres de importância agrônômica são na maioria das vezes de natureza quantitativa, e estão distribuídos pelo genoma em regiões definidas como QTL (*Quantitative Trait Loci*). Mapear esses QTL significa identificar sua posição no genoma e estimar seus efeitos (TOLEDO et al., 2008).

Os marcadores microsatélites são ferramentas importante para a identificação de regiões de interesse ao longo do genoma. Quando eles estão estreitamente ligados aos alelos de resistência, podem ser usados para a identificação de QTL. A seleção assistida por marcadores moleculares complementou o melhoramento genético tradicional, assim, o desenvolvimento de plantas se tornou um processo mais preciso e eficiente (DIAS NETO; JUSTINO, 2013).

O objetivo desse trabalho foi otimizar marcadores moleculares associados a QTL para resistência à queima da bainha à mancha parda em genótipos de arroz pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Arroz e Feijão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma monocotiledônea do gênero *Oryza* que pertence à família *Poaceas*. O cereal é fonte primária de energia e proteína e tem importância socioeconômica nos países em desenvolvimento, sendo alimento básico para mais da metade da população mundial. Ele é o alimento de possível combate à fome no mundo, já que a espécie fornece cerca de 20% de energia e 15% de proteína necessária ao homem (BORÉM; RANGEL, 2015).

Durante muito tempo foi questionado quando, como e onde o arroz foi cultivado e domesticado. Várias linhas de pesquisa evidenciaram as regiões do Sul da China, Índia, região do Rio Yangtze na China, a região dos cinturões no Himalaia e habitats do pântano costeiro no Sudeste Asiático como possíveis locais de origem do arroz. Com o desenvolvimento de novos procedimentos metodológicos como o uso de flotação foi possível recuperar restos macrobotânicos ricos em grãos de arroz e cascas. A análise de fitólitos também foi útil para identificar restos microscópicos de plantas. Assim, as descobertas atuais de genética e arqueológica são consistentes com a domesticação de *O. sativa* japônica no vale do rio Yangtze, no sul da China (GROSS; ZHAO, 2014).

A gramínea é adaptada ao ambiente aquático, apresenta ciclo anual e possui algumas características morfológicas próprias. A raiz seminal e as laterais persistem por um curto período de tempo durante a germinação e logo são substituídas pelas raízes adventícias. Quando a espécie é cultivada em sistema de sequeiro, a raiz pode chegar até um metro ou mais de profundidade, já em cultivo irrigado dificilmente ela excede 40 cm (BORÉM; RANGEL, 2015).

O colmo do arroz é composto por nós, que dão origem a uma folha e uma gema e por entrenós. Do colmo principal surgem os perfilhos, oriundos dos nós basais. Os perfilhos primários dão origem aos perfilhos secundários, que dão origem aos terciários. As folhas do arroz são compostas por lâmina de nervuras paralelas, bainha, lígula e aurícula dispostas no colmo de forma alternada. A panícula é a inflorescência da planta que se localiza sobre o último entrenó do colmo, ela é composta de ráquis, ramificação primária e secundária, espiguetas e pedicelo. O fruto do arroz é uma cariopse, onde uma única semente é fundida à parede do pericarpo, formando um grão (BORÉM; RANGEL, 2015). As partes morfológicas da planta podem ser observadas na Figura 1.

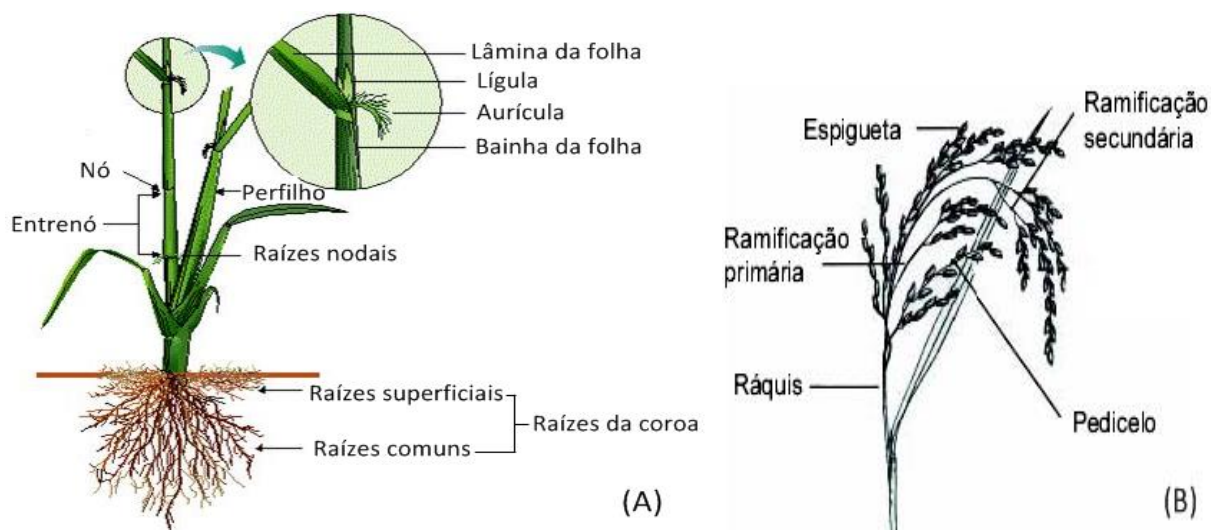


Figura 1. Morfologia dos órgãos vegetativos da planta de arroz (A) e panícula (B).

Fonte: Adaptado de OLMOS (2007) (A); Adaptado de VERGARA (1979) (B).

No Brasil, o cultivo de arroz iniciou-se no estado da Bahia, no ano de 1587, se estendendo mais tarde para o Maranhão. Porém, foi só na metade do século XVIII que o cereal foi cultivado de forma racional e organizada. Nesse período, o país se tornou um grande exportador de arroz até meados do século XIX (CONAB, 2015).

O Brasil possui dois principais sistemas de cultivo de arroz: o irrigado e o de terras altas, também chamado de arroz de sequeiro. Na safra 2016/17 foram cultivados 597.336 ha em sistema de sequeiro com uma produção de 1.384.416 toneladas e produtividade média de 2318 kg.ha. Já em cultivo irrigado a produção foi de 11.083.101 toneladas em uma área de 1.431.936ha, com produtividade média de 7.740 kg.ha (SILVA, 2018).

2.2 Importância econômica de doenças fúngicas

Durante a história da humanidade vários acontecimentos têm evidenciado a importância das doenças fúngicas nas culturas devido seu alto grau de infestação e severidade. Um exemplo foi a chamada “fome da batata”, que ocorreu na Irlanda durante os anos de 1845 a 1849. A batata (*Solanum tuberosum*) era cultivada através de uma única espécie desenvolvida por meio do melhoramento genético. As lavouras cultivadas foram atacadas pelo fungo, hoje classificado como oomiceto, *Phytophthora infestans* causando danos irreversíveis. Com a perda da safra houve morte de um milhão de pessoas, já que estas tinham a solanácea como alimento básico (AZEVEDO, 2018).

Outro exemplo é o mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* que ataca, principalmente, a cultura da soja (*Glycine max* L.). Contudo, esta doença possui mais de 400 espécies hospedeiras entre as plantas registradas. Pelo fato do patógeno ser necrotrófico e cosmopolita, os inóculos sobrevivem no solo infectando as safras posteriores e tornando a rotação de culturas pouco eficiente (TUPICH et al., 2017). A doença tem sido um dos principais fatores limitantes para a produção da soja no Brasil. Estima-se que cerca de 10 milhões de hectares brasileiros cultivados com a cultura estejam infestados com o patógeno (GODOY et al., 2018).

A mancha parda, considerada a segunda doença mais importante da cultura do arroz, causa danos de 12% a 30% na massa de grãos e de 18% a 22% no número de grãos cheios por panícula (SANTOS et al., 2011). Os prejuízos não são apenas danos de nível econômico, mas também ambiental em função do uso excessivo de fungicidas, para o controle da doença (CARVALHO; MORAES, 2016).

2.3 Doenças da cultura do arroz

O arroz é uma cultura suscetível ao ataque de vários patógenos, sendo eles os principais responsáveis pela redução na produtividade e qualidade de grãos. Entre vírus, nematoides, fungos e bactérias mais de 80 doenças já foram registradas na literatura. No Brasil as principais doenças na cultura do arroz são causadas por fungos. Devido ao clima favorável de várias regiões tropicais no país como no Norte e Centro-oeste, a severidade da doença tende a ser maior quando comparada com as regiões de clima subtropical, como no Sul do país (BORÉM; RANGEL, 2015).

Das doenças que atacam a cultura, a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, ocasiona prejuízos significativos nas cultivares suscetíveis (LOBO, FILIPPI; PRABHU, 2018). As perdas nas lavouras, causadas pela presença da doença, podem chegar até 100% dependendo da época de plantio, da cultivar plantada e das condições climáticas. Estima-se que por ano, no mundo inteiro, os prejuízos decorrentes da infestação da doença na cultura chegam a 70 bilhões de dólares (BORÉM; RANGEL, 2015).

Existem outras doenças que são consideradas de baixo potencial econômico e que têm sido frequente nas regiões de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Entre elas estão a mancha parda (*Bipolaris oryzae*), a mancha estreita (*Cercospora oryzae*) e a escaldadura (*Monographella albescens*), sendo que essas doenças ocorrem normalmente nas folhas.

Também tem sido comum algumas doenças que afetam colmo e bainha como a podridão do colmo (*Sclerotium oryzae*), o mal do pé (*Gaeumannomyces graminis*), a podridão da bainha (*Sarocladium oryzae*), e a queima da bainha (*Rhizoctonia solani*) (SOSBAI, 2016).

Em experimento desenvolvido por Dallagnol et al (2006), foram avaliados os danos das doenças foliares na cultura do arroz irrigado e observou-se que as doenças citadas acima juntamente com as manchas dos grãos comprometeram o rendimento de grãos em até 42,1 %. Estes autores também confirmaram a correlação positiva entre lesões foliares e mancha de grãos, evidenciando que a ocorrência das doenças nas folhas serve de fonte de inóculo do patógeno para os grãos.

As doenças como a mancha de grãos e a queima da bainha eram consideradas pouco importantes, porém, em algumas regiões como no Vale do Araguaia elas têm causado danos maiores nas lavouras quando comparados aos da brusone. Uma das principal consequência do aumento da incidência dessas doenças é a elevação dos custos de produção no arroz irrigado (CORDEIRO; TORGA, 2017).

2.3.1 Mancha Parda

A mancha parda tem como agente causal o fungo *Bipolaris oryzae* que também é um dos principais causadores da mancha-de-grãos. A doença está disseminada em lavouras rizícolas do mundo inteiro e possui maior importância em países de clima tropical (AMORIM, REZENDE, CAMARGO, 2016).

No Brasil a mancha parda é frequentemente encontrada na cultura do arroz, estando presente tanto no sistema de cultivo irrigado, quanto no de sequeiro. Esta doença tem causado danos econômicos significativos à cultura do arroz no Brasil, afetando tanto lavouras que são semeadas na safra de verão, em meados de outubro, quanto plantas adultas que estão próximas ao estágio de maturação (BEN et al., 2013).

O patógeno é um fungo necrotrófico capaz de sobreviver em restos de palhadas, sementes e no solo, através dos escleródios. As sementes infectadas e os restos culturais são as principais fontes de inóculo do patógeno. A ocorrência do fungo é favorecida por alta umidade relativa do ar, acima de 89% (LOBO, FILIPPI, PRABHU, 2018) e por temperaturas entre 20 e 30°C (AMORIM; REZENDE; CAMARGO, 2016).

Os sintomas da mancha parda se manifestam tanto nas folhas, como nos grãos e sementes. Nas folhas, inicialmente surgem pequenas manchas circulares de coloração marrom

e com a evolução da doença essas manchas se tornam ovaladas com coloração marrom-avermelhada ou marrom-escura com o centro acinzentado (ALVES; MIRANDA, 2018).

As manchas ocorrem geralmente de forma isolada nas folhas, mas em situações de ataques severos elas podem se unir e cobrir toda a folha. Os grãos podem ter a sua superfície coberta pelo fungo causando o gessamento, redução de peso e esterilidade. Nas sementes o fungo pode sobreviver por um período entre um e quatro anos, causando a redução na taxa germinativa e inviabilizando a planta oriunda da semente contaminada (AMORIM; REZENDE, CAMARGO, 2016). Os sintomas da doença podem se manifestar também após a emissão das panículas infecionando as espiguetas e provocando esterilidade. (BEN, 2013). Os sintomas da mancha parda nas folhas e grãos podem ser observados na Figura 2.



Figura 2. Sintomas da mancha parda nas folhas (A) e grãos de arroz (B)

Fonte: 2.b Adaptado de AGROLINK (2018).

As sementes infectadas pelo fungo apresentam perdas de 12% a 30% do peso de grãos e os grãos manchados também causam perdas no rendimento de engenho (BEN et al., 2013). Já foi constatado, em seis variedades avaliadas na região Norte do Brasil, perdas de até 30% de produtividade na cultura devido a infestação da doença. Os danos causados pelo fungo na cultura ainda são subestimados devido a sua semelhança com os sintomas da Brusone (AMORIM; REZENDE; CAMARGO, 2016).

2.3.2 Queima da bainha

A queima da bainha é causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn. Na cultura do arroz a doença é considerada de importância secundária, porém ultimamente, ela tem ocorrido em níveis expressivos nas lavouras orizícolas do país inteiro. No estado do Tocantins a queima da bainha está presente em todas as lavouras irrigadas. No Rio Grande do Sul a ocorrência da doença também tem aumentado de maneira significativa devido à introdução de cultivares suscetíveis ao patógeno e a prática do cultivo de arroz em rotação ou sucessão com a soja e pastagens (AMORIM; REZENDE; CAMARGO, 2016).

A queima da bainha pode vir a se tornar uma das principais doenças do arroz assim como a Brusone, principalmente pela previsão do aumento de temperaturas mínimas e máximas na Região Sul do Brasil, e também pelas rotações de culturas inapropriadas (AGUIAR, 2016). De acordo com Dias; Berbara; Fernandes et al.,(2013), o fungo tem capacidade de viver no solo saprofiticamente ou pode se instalar em outras culturas que também são hospedeiras, em animais ou em outros fungos.

A sobrevivência de *R. solani* é possibilitada por estruturas chamadas de escleródios, os quais possuem forma globosa, é de coloração marrom-escuro e podem chegar até 5mm de diâmetro. Os escleródios podem sobreviver no solo por mais de dois anos ou então ir se acumulando quando ocorre a sucessão do cultivo de arroz ou a rotação com espécies hospedeiras, como é o caso da soja (BORÉM; RANGEL, 2015).

No cultivo irrigado os primeiros sintomas da doença se manifestam nas bainhas e colmos próximos ao nível da lâmina de água. Temperaturas entre 28°C e 32 °C e umidade em torno de 95% são fatores que favorecem o desenvolvimento das doenças, assim como a alta densidade de plantas e adubação pesada. Nessas condições os sintomas também podem ser encontrados não só nas bainhas que estão acima da lâmina de água, mas também nas folhas (AMORIM; REZENDE; CAMARGO, 2016; LOBO, 2018).

Quando infectada, a planta apresenta lesões na bainha e no colmo, as espiguetas ficam estéreis, reduzindo a produção e em estágios mais avançados pode causar a morte da planta (RANGEL; SANTOS; CAMARA, 2003). Com a ocorrência da doença também pode haver secamento total ou parcial das folhas, podendo provocar o acamamento da planta. As manchas que caracterizam a doença são ovaladas, arredondadas ou elípticas e de coloração branco-acinzentado com extremidades bem definidas de cor marrom. (LOBO; FILIPPI; PRABHU,

2018). Os sintomas da queima da bainha nos colmos e bainha podem ser observados na Figura 3.



Figura 3. Sintomas do fungo *Rhizoctonia solani* nos colmos e bainhas.
Fonte: CORTE (2012).

2.4 Estratégias de manejo para o controle de doenças fúngicas

As doenças causadas por fungos são os principais problemas do cultivo de arroz não só no Brasil, mas no mundo inteiro. O que agrava mais ainda esse quadro é o fato de não existirem cultivares resistentes a doenças fúngicas e nas áreas cultivadas o plantio da cultura é consecutivo, resultando no uso intensivo de fungicidas (BORDIN et al., 2016).

A perspectiva da agricultura racional, entre outros fatores, é o aumento da produtividade em uma unidade de área e sanidade do produto. Assim, se torna o importante o controle de doenças, que é a utilização de estratégias conjuntas que visam impedir ou diminuir a incidência de doenças de plantas evitando ou reduzindo os prejuízos causados (REIS; CASA; BIANCHIN, 2011).

Os produtores de arroz, em busca de produtividade mais elevadas demandam por novas tecnologias para o manejo de insumos, aliado ao potencial genético de novas cultivares, com destaque à antecipação da época de semeadura (NUNES et al., 2011). O controle de doenças usando variedades resistentes, desenvolvidas a partir do melhoramento genético, constitui a forma mais barata e de fácil utilização para esta finalidade. Além disso, é também a estratégia menos agressiva ao meio ambiente quando comparada com o uso de defensivos

agrícolas, a exposição do agricultor a esses produtos é menor e o consumidor não ingere produtos químicos. (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2019)

A drenagem das áreas baixas e alagadiças permite o preparo antecipado do solo fazendo com que os restos culturais se mineralizam desfavorecendo os fungos de solo. O uso de sementes livre de patógenos, a semeadura em épocas desfavoráveis ao fungo e o controle de plantas daninhas também são práticas que evitam a proliferação do patógeno na área (SOSBAI, 2016). Na presença da doença, os danos causados podem ser expressivamente reduzidos através do manejo integrado e da utilização de práticas apropriadas, como o uso de defensivos agrícolas, por meio do controle biológico e do uso de cultivares resistentes desenvolvidas a partir do melhoramento genético (MARTINS et al., 2011).

A rotação de culturas reduz a incidência do fungo através da supressão de alimentos pois aumenta a atividade de micro-organismos antagonistas no solo. Quando a principal fonte nutricional do fungo é retirada, que são os restos culturais, rapidamente aumenta a competição microbiana e inanição dos fungos (REIS; CASA; BIANCHIN, 2011). Embora a rotação de culturas seja importante para o manejo integrado de pragas e doenças, ainda existe resistência por parte do produtor em sua implantação, pois este opta por determinada cultura em função da previsão das melhores oportunidades de comercialização do produto final (ATAYDE, 2013).

O uso de defensivos agrícolas para o controle de doenças fitopatogênicas já é uma prática consolidada e considerada necessária, pois permite a exploração do potencial de produtividade da cultura. O uso frequente desse método se explica devido ao fato de que o nível de resistência genética não ser satisfatória para o controle de algumas doenças, tornando necessário o uso de medidas mais emergentes (BORDIN et al., 2011).

Entretanto, esses produtos químicos apresentam aspectos negativos, como o período de carência de grande parte dos fungicidas empregados na cultura do arroz irrigado ser igual ou superior a trinta dias (AGROFIT, 2018), sendo que, muito frequentemente, a água de irrigação é liberada ou mesmo os grãos são colhidos sem obedecer este período, o que pode oferecer riscos à saúde humana e ao meio ambiente (SCHEUERMANN; REBELO; HICKEL, 2017).

Outro aspecto que inviabiliza o uso dos fungicidas é o fato de que seu controle não tem sido eficiente aos danos verificados nas lavouras orizícolas (NUNES, 2013) e também pelo surgimento de isolados de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ et al., 2000). Nas últimas décadas inúmeros problemas foram desencadeados devido ao uso intensivo desses produtos, como por exemplo

resistência microbiana, contaminação ambiental da água, solo, de produtores e consumidores e também a elevação dos custos de produção (SEIXAS et al., 2011).

Apesar das inúmeras pesquisas realizadas com métodos alternativos e suas vantagens, o controle biológico ainda apresenta várias limitações que estão relacionadas principalmente com a qualidade desses produtos, o registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a ausência de fornecedores capacitados, controle e qualidade e principalmente o pequeno número de agricultores que possuem sistema integrado de manejo, usando métodos alternativos, para troca de informações e experiências (MORANDI et al., 2009)

Neste contexto, o desenvolvimento de cultivares resistentes através dos programas de melhoramento genético, é a forma mais eficiente para o controle de doenças, tanto pelas vantagens econômicas quanto ambientais. O uso de ferramentas moleculares pode ser bastante útil no processo de transferência de alelos de resistência (DIAS NETO; JUSTINO, 2013).

2.5 Melhoramentos genético visando a resistência de doenças

De acordo com a Organização das Nações Unidas (2017) a população mundial é de aproximadamente 7,6 bilhões de pessoas, sendo que por ano existe um aumento de 83 milhões. As previsões são que no ano de 2030 a população mundial chegue 8,6 bilhões fazendo com que a demanda por alimentos básicos cresça simultaneamente. O aumento da produção pode ser feito pela expansão da área cultivada, melhoria das condições do ambiente e por meio do melhoramento genético de plantas (BORÉM, 2005).

O Brasil se destaca por ter a opção de expandir sua fronteira agrícola, porém essas áreas são limitadas e não estarão disponíveis no futuro. Em alguns países, como a China que possui uma alta densidade populacional e área agricultável restrita, os agricultores têm avançado em ecossistemas vulneráveis para conseguir suprir a demanda por alimentos e essa prática tem causando perdas irreparáveis. O aumento da produção também pode ser obtido através do manejo adequando, manipulando as condições ambientais como adubação, irrigação, manejo de pragas e doenças, sementes de qualidade etc. (BORÉM, 2005).

Assim, o melhoramento genético além de visar o aumento da produtividade também considera características importantes como a resistência de pragas e doenças, qualidade nutricional dos alimentos, entre outras (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2019). Apesar de alguns desafios terem limitado o progresso genético no desenvolvimento de novos cultivares,

a geração de novas tecnologias, como a biotecnologia, que permite a identificação e a seleção baseada diretamente no genótipo do indivíduo o progresso genético se tornou maior (COUTINHO, 2010).

As primeiras mudanças alélicas dirigidas se iniciaram de forma não intencional, com a seleção de sementes de plantas desejáveis. Com o avanço do conhecimento e o desenvolvimento de novas tecnologias, a prática de seleção foi evoluindo e o melhoramento se tornou mais uma ciência que uma arte. O melhoramento moderno é baseado em três etapas: desenvolvimento de progênies e a avaliação das mesmas seguido da recombinação das melhores. Assim, independentemente do método usado no melhoramento, a seleção é a principal ferramenta do melhorista, que deve possuir capacidade de selecionar indivíduos com características desejáveis dentro de uma população de indivíduos geneticamente diferentes (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2019).

Nos mais diversos programas de melhoramento genético de plantas, o processo de seleção dos genótipos que apresentam características agronomicamente desejáveis é realizado com base nas informações fenotípicas dos indivíduos. O melhoramento genético convencional também demanda tempo. Os ganhos genéticos são cada vez mais difíceis de serem obtidos, as despesas estão cada vez mais altas e as metodologias quase não mudaram ao longo das últimas décadas (TOPPA; JADOSKI 2012).

2.6 Uso das ferramentas biotecnológicas no melhoramento genético

A seleção de genótipos é um processo que muitas vezes pode ser trabalhoso principalmente para os caracteres de importância agrônômica de baixa herdabilidade, visto que, a maioria dos caracteres de importância agrônômica são de natureza quantitativa. Eles são controlados por um grande número de genes que são influenciados pelas interações ambientais na expressão do fenótipo (TOPPA; JADOSKI, 2012).

Uma das principais contribuições da biotecnologia para a agricultura foi o desenvolvimento de marcadores moleculares. Assim, foi possível diminuir o tempo para a obtenção de novas variedades pois, através do uso de marcadores é possível fazer a transferência e piramidação de alelos de resistência, o monitoramento de genes e no retrocruzamento pode ser usado para facilitar e acelerar a recuperação do genoma do genitor recorrente (ALZATE-MARIN et al., 2005).

A seleção de genitores baseada apenas em características agrônômicas pode ocasionar estreitamento na base genética do programa de melhoramento de plantas. Os marcadores moleculares viabilizam o planejamento dos cruzamentos através da escolha de genitores maximizando a heterose e as combinações gênicas desejáveis. Deste modo, as ferramentas biotecnológicas têm como principal objetivo complementar as técnicas convencionais de melhoramento que são indispensáveis no processo de seleção (FALEIRO; ANDRADE; REIS JÚNIOR, 2011).

No melhoramento convencional, a seleção dos genótipos desejáveis é baseada em informações fenotípicas, necessitando de técnicas experimentais elaboradas que influenciam diretamente no tempo e no custo do processo de seleção. As vantagens da seleção indireta usando marcadores moleculares em relação ao melhoramento convencional é a seleção precoce de caráter de baixa herdabilidade sem interferência ambiental, promovendo ganho de tempo e redução nos custos e aumento da precisão (CAVALCANTI, 2009).

O fato de não sofrer influência ambiental e permitir a seleção na ausência do patógeno também pode aumentar muito a eficácia do processo de seleção dos genótipos superiores (MORO, 2010). Além disso, a análise desses marcadores pode ser realizada em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e na maioria das vezes pode ser usado qualquer parte do tecido vegetal (ALKIMIM, 2013).

2.6.1 Seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)

Segundo Turchetto-Zolet et al. (2017), um marcador genético é qualquer caráter visível ou um fenótipo que de alguma forma seja analisável, para o qual os alelos em locos individuais segregam de forma mendeliana. Os primeiros marcadores eram associados a caracteres morfológicos, baseados no fenótipo do indivíduo. Com o surgimento dos marcadores bioquímicos, a partir da década de 60, o polimorfismo genético passou a ser detectado por meio de isoenzimas. Entretanto, a quantidade de genomas investigados é limitada pois, o número de locos que podem ser detectados é baixo, assim como o nível de polimorfismo identificado por loco.

Na década de 80, com o início da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi possível desenvolver marcadores moleculares utilizando *primers* específicos, multiplicando *in vitro* a quantidade de DNA de uma amostra e em escala exponencial. A PCR se baseia em ciclos repetidos de replicação em que, cada fragmento da molécula sintetizada em um ciclo serve de

molde para o ciclo seguinte, aumentando exponencialmente o número de moléculas (BORÉM; CAIXETA, 2016).

Um indivíduo diploide pode apresentar até dois alelos distintos num mesmo loco. Entretanto, pode haver polimorfismo, que é a presença de diferentes alelos em um mesmo loco. Essas variações nas sequências de bases de DNA são responsáveis pelas diferenças genéticas entre indivíduos de uma mesma população. Quando esses marcadores moleculares do DNA estão ligados estreitamente aos alelos de resistência, podem ser usados na SAM e facilitar a seleção de genótipos resistentes, disponibilizando-os para serem usados no programa de melhoramento genético (BORÉM; CAIXETA, 2016; DIAS NETO; JUSTINO, 2013).

Os caracteres de natureza quantitativa são aqueles cuja expressão fenotípica mostra uma distribuição contínua por apresentar segregação simultânea de muitos genes distribuídos pelo genoma, em regiões definidas como QTL (*Quantitative Trait Loci*). Mapear um QTL nada mais é que identificar a sua posição no genoma e os seus efeitos genéticos (TOLEDO et al., 2008). Para a localização desses QTL e obtenção de estimativas de seus efeitos e interações, são utilizadas ferramentas biométricas, com o auxílio de informações fornecidas pelos marcadores moleculares (SABADIN, 2010).

Existe um grande número de marcadores moleculares desenvolvidos para diferentes espécies vegetais, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*), os AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), os RAPDs (*Random Amplified Polymorphism DNA*), os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e os SSR (*Simple Sequence Repeats*) também chamados de microssatélites (BORÉM; CAIXETA, 2016)

2.6.2 Marcadores Microssatélites

Os genomas são ricos em regiões que apresentam sequências repetidas em *tandem*, variando entre um e seis nucleotídeos, que podem ser usadas como marcadores moleculares. Essas regiões são chamadas de microssatélites, também conhecidas como SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*) (BARBOSA, 2010).

Enquanto existe uma variação no número de repetição de nucleotídeos em um microssatélite, geralmente, as sequências de DNA que o flanqueiam são conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie. Isso possibilita o desenho de primers específicos para as

sequências adjuntas a um dado microssatélite de forma que seja possível amplificar esse loco em diferentes genótipos, através de uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* (FERRÃO, 2013).

Pela técnica de PCR é possível revelar o polimorfismo presente nos microssatélites, com o uso de dois iniciadores únicos, os primers. Esses possuem aproximadamente 20 nucleotídeos específicos que são complementares a sequência flanqueadora de cada marcador (locus) (CAMACHO, 2016). Os primers iniciadores estão representados a baixo (Figura 4):

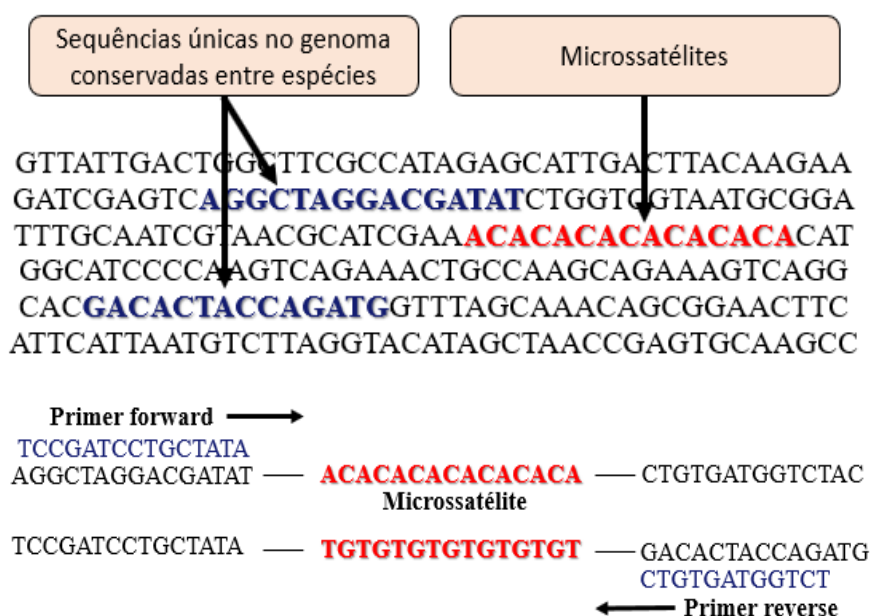


Figura 4. Representação esquemática da especificidade dos primers desenhados a partir dos microssatélites - a sequências únicas dos microssatélites servem como molde para a síntese dos iniciadores.

Fonte: Adaptado de Camacho (2016).

Os marcadores microssatélites possuem algumas especificidades que o tornam viáveis na seleção assistida, como o fato de serem codominantes, ou seja, possibilitam diferencia indivíduos homozigotos e heterozigotos, são de baixo custo, multialélicos, não há necessidade do uso de radioatividade, dependem de pequena quantidade de DNA do material e é abundante, pois, aparentemente está distribuído em todo o genoma (BUSO, et al. 2003)

Até mesmo em germoplasmas de base estreita o conteúdo informativo de um loco SSR é bastante alto, isso se deve ao fato de serem sequências de alta taxa evolutiva. Entretanto, alguns fatores limitam o uso dos marcadores SSR com o alto custo para a obtenção dos primers usados na PCR e a intensiva mão de obra usada no desenvolvimento dos mesmos (BUSO et al. 2003).

Brunes et al. (2007) utilizou em seu trabalho 51 marcadores moleculares do tipo microsatélite, sendo que, desses, quatro foram capazes de identificar polimorfismo entre arroz vermelho e arroz cultivado. Assim, foi possível identificar o fluxo gênico entre os tipos de arroz avaliados, o que significa que, esses marcadores também podem ser usados juntamente com outras metodologias, para melhorar a precisão das estimativas da taxa de polinização cruzada em arroz.

2.7 Validação dos marcadores

Vários programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares resistentes buscam marcadores moleculares que estão ligados à resistência às doenças para serem usados na SAM. Esses vários QTL descritos na literatura podem auxiliar na seleção de genótipos de interesse, desde que se faça antes a validação dos QTL em diferentes genótipos e ambientes dos que foram testados inicialmente. O processo de validação de QTL é fundamental para identificar os marcadores moleculares que estão efetivamente associados a esses. Assim, o processo de validação consiste na identificação dos QTL nas mesmas regiões em que foram identificados e descritos na literatura, porém em diferentes ambientes e com *backgrounds* genéticos distintos (MORCELI et al., 2008)

Pode existir diferença na detecção do QTL identificado em um genótipo quando este genótipo estiver presente em ambientes distintos, e isso pode estar associado, entre outros aspectos, ao modelo estatístico utilizado durante o mapeamento de QTL, para estimar o efeito e posição do mesmo e, consequentemente no número de variáveis consideradas. Por exemplo, o modelo de mapeamento por intervalo simples considera apenas o efeito de dois marcadores sobre o QTL e o modelo de mapeamento por intervalo composto tem um poder de detecção maior pois isola o efeito de outros marcadores sobre o QTL (SENRA, 2013).

Quando esses marcadores são desenvolvidos em genótipos diferentes dos usados em um programa de melhoramento, é necessário fazer a validação dos mesmos, para serem utilizados como fontes de resistência (SILVA et al., 2008). Para o programa de melhoramento é de extrema importância a identificação de QTL estáveis em diferentes *backgrounds* genéticos e ambientes garantem maior precisão na localização e identificação de QTL para que esses possam ser usados na SAM (SOUZA et al., 2012).

Em uma tentativa de identificar a presença de aroma em arroz, através de métodos mais confiáveis, Quixabeira et al (2017) testou três marcadores moleculares já descritos na literatura

para a seleção precoce de genótipos aromáticos. Assim, apenas um dos marcadores, o ASA, apresentou produtos com uma boa amplificação sendo utilizado para auxiliar a seleção de plantas detentoras do alelo específico à presença do aroma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido na Embrapa Arroz e Feijão, localizada no Município de Santo Antônio de Goiás, GO. Foram identificados na literatura, 26 marcadores microssatélites próximos a QTL associados à resistência à mancha parda e à queima da bainha (Tabela 1). Para os marcadores que não eram originalmente microssatélites, foi feito uma busca no programa GRAMENE (2018) para identificar marcadores microssatélites que fisicamente estão próximos a esse loco.

Tabela 1. Descrição dos 26 marcadores moleculares utilizados na validação para resistência à mancha parda e a queima da bainha em arroz.

Marcador	Primers	Associação*	Comprimento (pb)*	Referência
RM109	R-GCCGCCGGAGAGGGAGAGAGAG F-CCCCGACGGGATCTCCATCGTC	MP	97	Katara et al.(2010)
RM485	R-CACACTTTCCAGTCTCTCTCC F-CATCTTCTCTCTCTCGGCAC	MP	290	
RM3732	R-ATCCACAACTCAGATGGGC F-TGCCACGCGATTGAAGAC	MP	106	
RM423	R-AGCACCCATGCCTTATGTTG F-CCTTTTTCAGTAGCCCTCCC	MP	273	
RM6424	R-AGCGAATCAGGTGACTCCAC F-ACACCATCCATCTCCAGTCC	MP	101	
RM530	R-GCACTGACCACGACTGTTTG F-ACCGTAACCCGGATCTATCC	MP	161	
RM518	R-CTCTTCACTCACTCACCATGG F-ATCCATCTGGAGCAAGCAAC	MP	171	
RM4504	R-TAATTGATGAGCTTGATGTA F-AGAGAGATTTTATGAAACCA	MP	127	
RM3515	R-AGAGAGAATCAGAAACACCAAC F-GGAAAGAAGATATGCCATGC	MP	196	Sato et al. (2008)
RM3907	R-GGAGGCCAAGGAAGAGGTAG F-CGTCAATGGGGTAGGTCTTG	MP	135	
RM566	R-ACCCAACTACGATCAGCTCG F-CTCCAGGAACACGCTCTTTC	MP	230	
RM6499	R-TAGCGATGGGGGTCAAGTC F-CACCATGGAGTCCCATGAG	MP	154	
RM6623	R-AGATTCTTGCGAGCGAGG F-GACACACAAACACCTCACACACC	MP	196	

Fonte: adaptado de GRAMENE (2018)

*pb: pares de bases; *MP: mancha parda; *QB: queima da bainha

R: Iniciador que vai hibridar com a cadeia de DNA molde na direção 3'

F: Iniciador que vai hibridar com a cadeia de DNA molde na direção 5'

Tabela 1. Descrição dos marcadores moleculares utilizados na validação para resistência à mancha parda e a queima da bainha em arroz (continuação).

Marcador	Primers	Associação*	Comprimento (pb)*	Referência
RM212	R-CCACTTTCAGCTACTACCAG F-CACCCATTTGTCTCTCATTATG	QB	136	Srinivasachary et al. (2010)
RM319	R-ATCAAGGTACCTAGACCACCAC F-TCCTGGTGCAGCTATGTCTG	QB	134	
RM102	R-AACTTTCCCACCACCACCGCGG F-AGCAGCAGCAAGCCAGCAAGCG	QB	311	
RM 486	R-CCCCCTCTCTCTCTCTCTC F-TAGCCACATCAACAGCTTGC	QB	104	
RM300	R-GCTTAAGGACTTCTGCGAACC F-CAACAGCGATCCACATCATC	QB	121	
RM327	R-CTACTCCTCTGTCCCTCCTCTC F-CCAGCTAGACACAATCGAGC	QB	213	
RM29	R-CAGGGACCCACCTGTCATAC F-AACGTTGGTCATATCGGTGG	QB	250	
RM501	R-GCCCAATTAATGTACAGGCG F-ATATCGTTTAGCCGTGCTGC	QB	179	
RG20	R-TTATCTGCCACCTGAGTCCC F-ACTTGGCGACTCTGATCTGC	QB	156	
RM38	R-ACGAGCTCTCGATCAGCCTA F-TCGGTCTCCATGTCCCAC	QB	250	
RM524	R-TGAAGAGCAGGAACCGTAGG F-TCTGATATCGGTTCCCTTCGG	QB	198	
RM342B	R-CCATCCTCCTACTTCAATGAAG F-ACTATGCAGTGGTGTACCCC	QB	141	
RM1361	R-ATTCTCTCCGCCTAAACAAC F-TTCTCGTGCACAGTTAATACC	QB	214	

Fonte: adaptado de GRAMENE (2018)

*pb: pares de bases; *MP: mancha parda; *QB: queima da bainha

R: Iniciador que vai hibridar com a cadeia de DNA molde na direção 3'

F: Iniciador que vai hibridar com a cadeia de DNA molde na direção 5'

Após a identificação foi feita a síntese dos primers que foram utilizados para amplificar os fragmentos de DNA nas amostras. Foram utilizados 32 genótipos de arroz, representado por 3 plantas cada, totalizando 96 amostras. Esses genótipos foram previamente identificados como resistentes ou suscetíveis para as doenças mancha parda e/ou queima da bainha (Tabela 2), em uma atividade conduzida no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão. Todos os genótipos integram o acervo do Banco Ativo de Germoplasma de Arroz (BAG Arroz) da

Embrapa Arroz e Feijão e estão representados por variedades tradicionais, cultivares brasileiras e introduzidas de *Oryza sativa*, com exceção do genótipo *Oryza glaberrima* W 25-A.

Tabela 2. Resposta de genótipos de arroz à inoculação com *Rhizoctonia solani* e *Bipolaris oryzae* que causam mancha parda e queima da bainha, respectivamente.

Genótipos	Mancha Parda	Queima da bainha
EEA 405	R	S
EEA 401	R	S
Ipeaco-sl 1969	R	S
Ipsl 2070	R	S
Ipsl 574	R	S
Colômbia 1	R	S
Kh.khao bay	R	S
Lebonnet	R	S
Eloni	R	S
Carolina sp.407	R	S
Tetep	R	R
Oryza glaberrima W 25-A	R	S
Tadukan	R	S
BRS Pepita	R	S
Minami Hata Mochi	R	S
Irga 418	R	S
BRA 02535	R	S
Pedregulho	R	S
Javanes	R	S
Moroberekan	R	S
CT 9993-5-10-1-m	R	S
Minami hata mochi	R	S
Tadukan	R	S
IR 64	R	S
BRS Pampa	R	S
IR 34	S	S
BRS A702 CL	S	S
BRS Jaburu	S	S
Irga 418	S	S
Pedregulho	S	S
Javanês	S	S
Côco	S	S

*R: resistente; *S: suscetível

O plantio foi realizado em março de 2018 em casa de vegetação utilizando copos descartáveis de polietileno com volume de 200 ml contendo substrato comercial. Em cada copo foi mantida uma planta, devidamente identificada, até a emissão da terceira folha. Para o isolamento do DNA genômico, foram coletados em média, 80 mg de tecido foliar em microtubos *Eppendorf* de 1,5 ml, armazenados à temperatura de -20°C, no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Arroz e Feijão.

A extração de DNA das folhas de arroz foi realizada com base no protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983) com algumas adaptações. Em cada tubo foi colocado uma beads e adicionado 500µL de tampão de extração (TE), constituído de Tris-HCl 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; NaCl. O tecido foi macerado no Mini Beadbeater-96 durante 20 segundos. Para o rompimento das membranas celulares e exteriorização do DNA foram adicionados 33µl de SDS 20% na solução, agitada em vortex. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C durante 10 minutos. Após a incubação, foi adicionado 160µl de KoAc 5M, agitado em vórtex e centrifugado a 13000 rpm (rotação por minuto) durante 10 minutos. Foi removido 450µL do sobrenadante e colocado em um novo tubo.

Para a precipitação dos ácidos nucléicos foi adicionado 270µL de isopropanol absoluto e homogeneizado através da inversão dos microtubos. Após essa etapa, as amostras ficaram em repouso, durante 20 minutos, no freezer.

Em seguida, foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, ficando apenas o *pellet* que foi lavado com 500 µL de etanol 70%. Novamente as amostras foram centrifugadas velocidade de 13.000 rpm durante cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 500 µL de etanol absoluto e centrifugado por cinco minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o microtubo ficou em repouso durante 25 minutos a temperatura ambiente para que fosse feito a secagem do *pellet*.

Após a secagem, foi adicionado 50µL de TE contendo RNase, e, as amostras foram mantidas na estufa a 37°C por 30 min. A concentração do DNA extraído foi estimada por espectrofotometria em NanoDrop 2000 (ThermoScientific®, Waltham/EUA) usando 2µL de amostra. O DNA foi diluído em água milli-Q para uma concentração de 30 ng/µL para serem utilizadas como solução de trabalho, e parte foi estocada a -20 °C, para uso posterior.

Para a padronização das reações de amplificação cada primer foi testado inicialmente em sete indivíduos. Nesse processo, as reações de PCR foram feitas com temperaturas de anelamento variando entre 51°C a 67°C com diferentes quantidades de DNA, entre 5µL e 3µL

por amostra. Ao determinar a temperatura e quantidade de DNA a ser usada em cada par de primer, estes, foram utilizados na amplificação das 71 amostras.

As reações de amplificação das amostras foram feitas de acordo com o protocolo descrito por Brondani et al. (2007). Utilizou-se o produto comercial Master Mix (QIAGEN Multiplex PCR Kit), Q Solution e água livre de nuclease. Os protocolos das reações de PCR foram realizados de acordo com a amplificação de cada primer: a PCR 1 constituída por 5 µL de Master Mix, 1 µL de Q-solution, 0,9 µL de água, além de 0,05 µL de cada primer específico (*reverse e foward*) na concentração de 10,0 µM e para a PCR 2 a concentração foi de 5 µL de Master Mix, 1 µL de Q-solution, 0,84 µL de água e 0,08 µL de cada primer. O volume final das reações foram de 10 µL para cada amostra. Durante o processo de otimização, para algumas amostras que não amplificaram bem, o volume do primer foi ajustado sendo que algumas amostras chegaram a utilizar até 4µL de primer que foi subtraído do valor da água.

As reações foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System, modelo 9700 (Applied Biosystems), utilizando-se as seguintes condições: i) desnaturação a 95°C por 15 minuto; ii) 40 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, anelamento com temperatura entre 54°C e 56°C, de acordo com o primer, durante um minuto e meio e uma etapa de extensão com 72°C durante um minuto e meio; iii) extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) para separação dos mesmos. A corrida do gel foi realizada com tensão elétrica de 80 volts por cerca de 2 horas, e, em seguida, os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg mL⁻¹). O resultado foi fotodocumentado por meio de luz UV, utilizando equipamento transiluminador (L-PIX EX- Locus) e programa computacional Locus. Para estimar o tamanho dos fragmentos, utilizaram-se marcadores de peso molecular de 100 pb (Invitrogen,- Thermo Fisher Scientific) e de 1 Kb (Cellco).

Os marcadores foram caracterizados como monomórficos ou polimórficos utilizando o marcador de peso molecular como referência. Nessa etapa foi realizada a leitura do gel, através da atribuição de alelos para cada amostra de acordo com o tamanho em pares de bases. Marcadores monomórficos foram os que obtiveram um único alelo (“a”). Para os marcadores polimórficos, foram observados mais de um alelo, nomeados “a”, “b” e “c”, do menor para o maior fragmento amplificado. Através da ferramenta MS Tools foi realizada a análise da frequência dos alelos de marcadores polimórficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bandas fantasmas, também chamadas de *stutter*, são amplificações de bandas inespecíficas. Dos 26 marcadores testados, cinco deles (19,2%) apresentaram bandas fantasmas: RM3907, RM6499, RM102, RM38 e RM342B. A Figura 5 ilustra o exemplo de um marcador com *stutter*.

Para tentativa de eliminação de tais bandas, foi utilizado 1,0µl de primer na reação, um total de 0,6 µl a mais em relação aos primeiros testes. Também foram realizados testes de temperatura, utilizando na reação maior concentração de DNA e DNA sem diluir. Foi feita também corrida das amostras em gel de agarose a 5%, para a tentativa de melhor separação dos fragmentos menores. Embora houve uma redução dos stutters, as bandas ainda ficaram de difícil visualização, não sendo possível fazer a genotipagem.

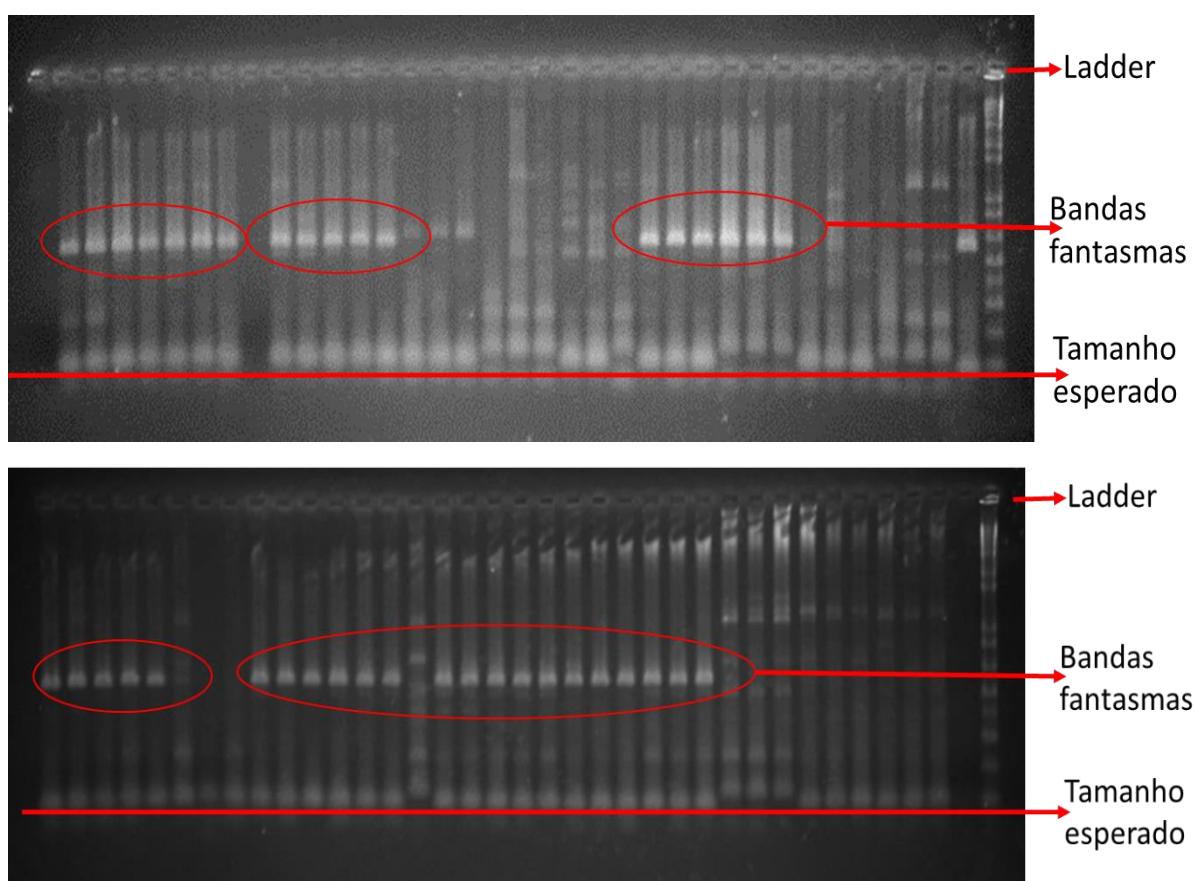


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose com a reação de amplificação com o marcador RM3907 apresentando *stutter* (Ladder 1 Kb). O tamanho esperado é de 135 pb.

De acordo com Pereira (2010) a ocorrência de bandas fantasmas é comum em regiões de microssatélites, pois, por serem constituídos por repetições de base. Sendo assim, a Taq

DNA polimerase pode cometer erros de incorporação de dNTPs com maior frequência comparada a regiões que não são de microssatélites. Essa ocorrência é chamada de *slippage* (ou escorrego) do DNA polimerase.

Bovo; Rugge; Shiao (1999) realizaram um trabalho descrevendo a origem das múltiplas bandas na amplificação de marcadores microssatélites. Foi observado que a intensidade de bandas múltiplas aumenta quanto maior é o número de ciclos de PCR confirmando que o número de ciclos para a amplificação de DNA durante a PCR precisa ser otimizado para cada marcador investigado. Nesse mesmo trabalho também foi testado o anelamento de primers com uma temperatura maior, não havendo resultado para o desaparecimento de bandas fantasmas. Uma outra alternativa para facilitar a detecção da banda real é o uso de gel desnaturante de poliacrilamida pois, ele é capaz de detectar polimorfismo de bandas com tamanhos menores (MACHADO; SILVA, 2013).

Em relação ao processo de otimização dos primers, houve uma variação de temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ em relação à temperatura de anelamento descrita na literatura (GRAMENE, 2018). Os resultados da otimização das temperaturas estão ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação entre a temperatura de anelamento dos primers descrita na literatura (GRAMENE, 2018) e a temperatura após o processo de otimização.

Primers	Temperatura da literatura ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura de otimização ($^{\circ}\text{C}$)
RM3732	55	51
RM530	55	51
RM212	55	51
RM518	55	53
RM319	55	53
RG20	50	54
RM3515	55	54
RM6623	55	54
RM300	55	54
RM327	55	54
RM29	55	54
RM501	55	54
RM485	55	55
RM423	55	55
RM6424	55	55
RM4504	55	55

Tabela 3. Relação entre a temperatura de anelamento dos primers descrita na literatura e a temperatura após o processo de otimização (continuação)

Primers	Temperatura da literatura (°C)	Temperatura de otimização (°C)
RM566	55	55
RM524	55	55
RM1361	55	55
RM 486	55	56
RM109	67	67

Machado (2013) obteve resultados positivos ao aumentar a temperatura de anelamento dos primers na cultura do mamoeiro, entre 63 e 64°C. Esses resultados são indicativos de que a otimização da temperatura de anelamento dos pares de iniciadores é passo importante para a amplificação de regiões genômicas específicas, livres de amplificações inespecíficas e bandas fantasmas.

Pela genotipagem foi possível identificar que, dos 21 marcadores testados, sete deles (33,3%) foram monomórficos para a população avaliada, ou seja, não apresentaram variabilidade genética, possuindo assim apenas um alelo. São eles: RM3732, EM6424, RM6623, RM319, RM486, RM300, RM524. Os marcadores identificados como monomórficos neste presente trabalho, foram os mesmos identificados como polimórficos nos artigos originais, descritos por Katara et al. (2010), Sato et al. (2008), Srinivasachary, et al. (2010). A Figura 6 ilustra o exemplo de um marcador monomórfico.

Assim, os marcadores comportam-se de forma diferente de acordo com o genótipo a ser avaliado. Os marcadores monomórficos não foram utilizados no estudo pois, não distinguem genótipos resistentes e suscetíveis. Carvalho (2017), em um processo de validação de marcadores, foi capaz de amplificar amostras que não foram visualizadas em trabalhos anteriores, tornando-os viáveis para o uso nas amostras testadas.

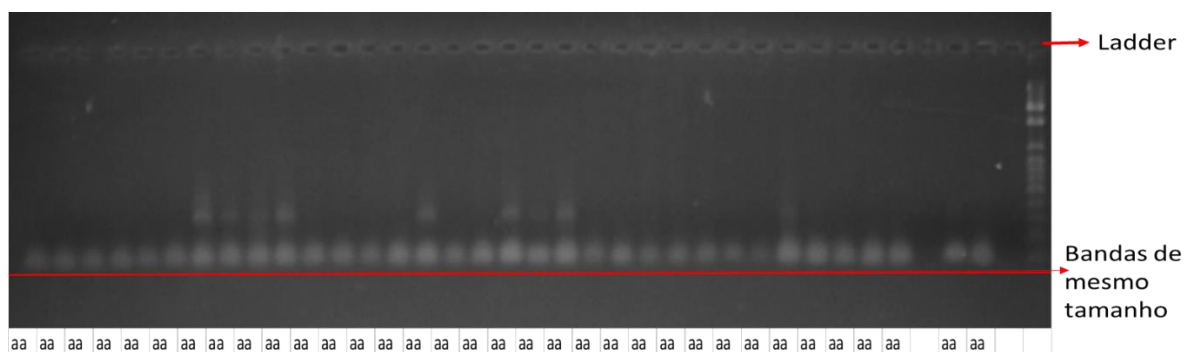


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose com a reação de amplificação do marcador RM6424, monomórfico, contendo os 27 genótipos (Ladder 1 Kb pb).

Para os 14 marcadores polimórficos (66,7%), oito deles apresentaram três alelos diferentes para cada loco analisado. Um exemplo é o marcador RM 485, que pode ser visto na Figura 7 ele possui 46 alelos “a”, 68 alelos “b” e 12 alelos “c”.

Tabela 4. Número de alelos observados para os marcadores polimórficos associados à mancha parda.

Marcador	Alelo a	Alelo b	Alelo c
RM109	102	58	0
RM485	46	68	12
RM423	62	66	2
RM530	18	128	10
RM518	140	17	1
RM4504	65	48	47
RM3515	71	75	2
RM566	66	44	10
Total	570	504	84

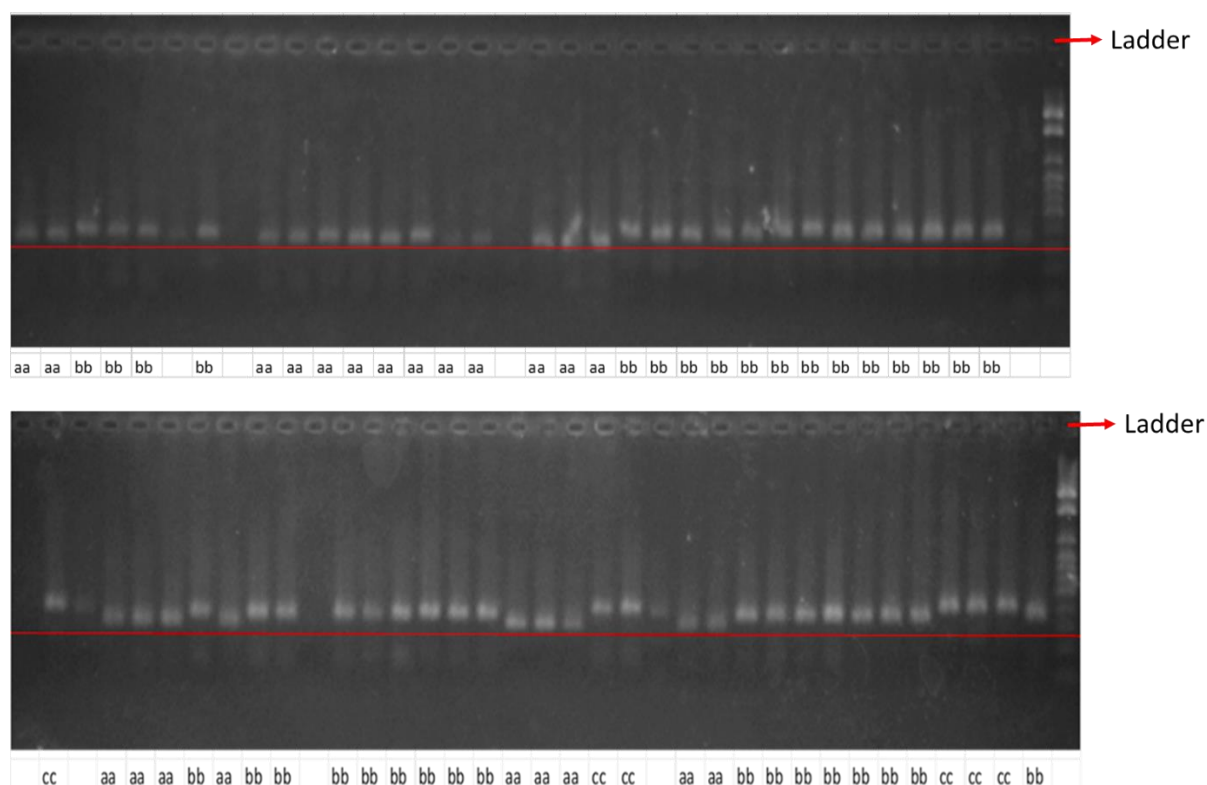


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose com a reação de amplificação do marcador RM485 contendo os 27 genótipos com seus devidos alelos (Ladder 100 pb).

Alguns genótipos não amplificaram para alguns locos, apresentando ausência de banda após a eletroforese. Para o marcador RM566, 20 amostras não amplificaram, sendo 28% do total de indivíduos testados. Resultado similar foi encontrado por Ng (2015), que de acordo

com o mesmo, a não amplificação das amostras pode ocorrer, entre outros fatores, devido a possibilidade de algumas reações não estarem completamente padronizadas.

No caso da queima da bainha, não foram identificados genótipos de arroz resistentes até o momento, na atividade conduzida no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão. Logo não será possível checar a associação entre os marcadores e a resistência para *Rhizoctonia solani*. Na literatura, há apenas um genótipo identificado como resistente a essa doença, a cultivar Tetep (SRINIVASACHARY et al.,2010). Assim, não foi possível associar esse marcador com a resistência à queima da bainha. Futuramente, com a identificação de novos genótipos resistentes será possível testar esses marcadores com o objetivo de finalizar o trabalho.

Para a mancha parda, por outro lado, será possível verificar se existe associação entre os marcadores e a resistência a mancha parda, já que para essa doença existem genótipos resistentes e suscetíveis. Além disso, esses marcadores selecionados, RM109, RM485, RM423, RM530, RM 518, RM4504, RM3515 e RM 566 são polimórficos.

5 CONCLUSÃO

Os marcadores associados a QTL de resistência à mancha parda não poderão ser validados pois, foi identificado apenas um genótipo que confere resistência à doença. Posteriormente, após a identificação de mais genótipos resistentes poderão ser feitos novos testes para a validação desses marcadores.

Os marcadores RM109, RM485, RM423, RM530, RM518, RM4504, RM3515 e RM566 foram polimórficos entre os genótipos avaliados. Assim esses marcadores são candidatos importantes para a confirmação da existência de associação entre marcadores moleculares e resistência a mancha parda.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Agrofit**, 2018. Disponível em:
<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 out. 2018.
- AGROLINK. **Agrolink**, 2018. Disponível em:
<https://www.agrolink.com.br/problemas/mancha-parda_1660.html>. Acesso em: 11 dez. 2018.
- AGUIAR, J. T. **Influência de variáveis macroclimáticas sobre as principais doenças do arroz**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola de agronomia e engenharia de alimentos, Goiânia, 2016.
- ALKIMIM, E. R. **Seleção assistida por marcadores moleculares para resistência múltipla à ferrugem e à antracnose dos frutos do cafeeiro**. 2013. 40 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- ALVES, G.; MIRANDA, S. **Defesa Vegetal**, 2018. Disponível em:
<<http://www.defesavegetal.net/cochmi>>. Acesso em: 11 nov. 2018.
- ALZATE-MARIN, A. L.; Cervigni¹, G.D. L.; Moreira¹, M. A.; Barros, A. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, p. 333-342, ago. 2005.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO; L. F. A. **Manual de fitopatologia**. 5°. ed. Ouro fino: Editora Agronômica Ceres, 2016. 573 p .
- ATAYDE, D. D. **Sistemas de rotação de culturas e infecção de grãos de milho por fusarium verticillioides em regiões produtoras no estado de São Paulo**. 2013. 126 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- AZEVEDO, J. L. D. O modelo industrial de produção de alimentos sob a perspectiva da sociedade de risco e do princípio da precaução. **Cadernos Ibero-americanos de Direito Sanitário**, Brasília, v. 4, p. 43-62, jan./mar. 2018.
- BARBOSA, A. C. D. O. F. **Evaluation of compatibility criteria among primers pairs for optimizing multiplex genotyping systems**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- BEN, C. A. V.; et al. Manejo químico de mancha-parda (*bipolaris oryzae*) na cultura do arroz irrigado. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2013, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: SOSBAI, 2013.
- BESPALHOK, F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. INTRODUÇÃO AO MELHORAMENTO DE plantas. **Bespa Agrárias**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

- BORDIN, L. C. et al. Influência do número de aplicações de fungicidas sobre o rendimento dos cultivares de arroz irrigado Epagri 109 e SCS 116 Satoru no Alto Vale do Itajaí/SC. In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 7., 2011, Balneário Camboriú. **Anais...Itajaí : Epagri** 2011. p. 547-550.
- BORDIN, L. C. et al. Efeito da aplicação de fungicidas no controle de doenças foliares de arroz irrigado e sua relação com o rendimento industrial. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 85-88, ago. 2016.
- BORÉM, A. A história da Biotecnologia. **Biotecnologia Ciência E Desenvolvimento**, p. 10-12, jun. 2005.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2016. 385 p.
- BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. **Arroz do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015. 242 p.
- BRUNES, T. O. et al. Fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado estimado por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, p. 86-92, jun. 2007.
- BUSO, G. S. C; et al. Marcadores Microssatélites. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 46-50, jan. 2003.
- BOVO, D; RUGGE, M; SHIAO, Y-H. Origin of spurious multiple bands in the amplification of microsatellite sequences. **Molecular Phatology**, London, v. 52, p. 50-51. 1999.
- CAMACHO, L. M. D. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética de populações de *Chrysolaena obovata* (ASTREACEAE)**. 2016.108 f. Tese (Doutorado em Análises Ambientais) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2016.
- CARVALHO, A. C.; MORAES, M. G. D. Monitoramento do patógeno visando melhoramento. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2016, Rio Grande do Sul. **Resumos...** Rio Grande do Sul: UFRG, 2016.
- CARVALHO A. N.. **Genotipagem e validação de marcadores indel em amostras com paternidade confirmada**. 2017. 60 f. TCC (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba, 2017.
- CAVALCANTI, J. J. V. Importância da seleção assistida por marcadores moleculares. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETA, 2009, Fortaleza. **Resumos...Fortaleza: SBFV** , 2009. p. 1-2.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **A cultura do arroz**. Brasília: Conab, 2015.
- CORDEIRO, A. C. C.; TORGA, P. P. Desenvolvimento de cultivares de arroz irrigado para a região tropical do Brasil no período de 2009 a 2014. **Embrapa**. p. 9 - 24, jul. 2017.

CORTE, G. D. Elevagro. Disponível em: <<https://elevagro.com/foto/sintomas-de-queima-da-bainha-rhizoctonia-solani-khun-em-arroz-irrigado/>>. Acesso em: 03 nov. 2019.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. D.; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v 24, p. 123-147, set. 2010.

DALLAGNOL, L. J; et al. Dano das doenças foliares na cultura do arroz irrigado e eficiência de controle dos fungicidas. **Brasileira Agrociência**, v. 12, p. 313-318, set. 2006.

DELLAPORTA, S. L. A plant DNA minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, p. 19-21, set. 1983.

DIAS NETO; JUSTINO, J.. **Mapeamento genético de QTLs de resistência ao agente causal da brusone (*Magnaporthe oryzae*) e avaliação de multilinhas de arroz resistentes ao patógeno**. 2013. 185 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013

DIAS, P. P. ; BERBARA, L. L.; FERNANDES, D. C. D. A. F. Controle de Rhizoctonia solani e Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli por biopreparados de isolados de Trichoderma spp. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 39, p. 258-262, outubro. 2013.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JUNIOR, F. B. dos. **Biotecnologia estado da arte e aplicação na agropecuária**. Planaltina: Embrapa, 2011. 729 p.

FAO. **Faostat** - Database 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 18 de setembro de 2018

FERRÃO, L. F. V. **Marcadores microssatélites em estudo de diversidade, mapeamento genético e análises de QTLs em Coffea canephora**. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

GRAMENE. 2018. Disponível em: <<http://www.gramene.org>>. Acesso em: 23 Janeiro 2018.

GROSS, B. L.; ZHAO, Z. Archeological and genetic insights into the origins of domesticated rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 1990-1997, abr. 2014.

KATARA, J. L. et al. Molecular analysis of QTLs associated with resistance to brown spot in rice. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, Raipur, p. 17-21, fev. 2010.

LOBO, V. L. D. S.; FILIPPI, M. C. C. D. F.; PRABHU, S. Manejo de doenças. **AGEITEC**, nov. 2018. Disponível em <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fuzvmwzg02wyiv80166sqfmvyttys.html>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. Brasília, v.48, p.1457-1463, nov. 2013.

MARTINS, E. D. M. et al. Comparação de métodos de inoculação e avaliação para resistência à queima da bainhas. In: VII CBAI,1, 2011. Balneário Camboriú. **Resumos...** Balneário Camboriú: CBAI, 2011. p. 587 - 590.

GODOY, C. V.; et al.. Eficiência de fungicidas para controle de a ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **EMBRAPA**, Londrina, 22 Ago. 2018. p.1-8.

MORANDI, M. A. B.; et al. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Infome agropecuário**, v. 30, p. 73-82, ago. 2009.

MORO, G. V. **Seleção Assistida por Marcadores Moleculares**. 2010. Dissertação (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

MORCELI, T. G.S.; et al. Identificação e validação de marcadores microssatélites ligados ao gene Rpp5 de resistência à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 43, p.1525-153, nov. 2008

NG, A. M. **Validação de marcadores inserção/deleção para genotipagem fetal não invasiva**. 2015. Dissertação (Mestrado em medicina) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

NUNES, C. D. M. **Doenças da cultura do arroz irrigado**. Pelotas : Embrapa, 2013. 80 p.

NUNES, C. D. M. et al. Efeito do tratamento de sementes com fungicida e inseticida na emergência da cultivar brs querência em diferentes épocas de semeadura. In: VII CBAI,1, 2011. Balneário Camboriú. **Resumos...** Balneário Camboriú: CBAI, 2011. p. 567-570.

OLMOS, S. Apunte de morfología, fenología, ecofisiología. **Acpaarrozcorrientes**. Corrientes, mar. 2006.

ONU. **World Population Prospects**. Organização das Nações Unidas. New York, p. 1-46. 2017.

PEREIRA, G. D. S. **Desenvolvimento de marcadores SSR, M-AFLP e SNP visando à integração de mapas genético-moleculares de Passiflora alata Curtis**. Dissertação (Mestrado em ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

QUIXABEIRA, M. M. et al. Validação de marcadores moleculares e seleção assistida do gene FGR. In: 11º SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS, 1, 2017, Santo Antônio de Goiás. **Resumos...** Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA, 2017. p 64.

RANGEL, P. H. N.; SANTOS, G. R. D.; CAMARA, R. K. Avaliação da reação de genótipos de arroz irrigado à queima e mancha das bainhas em Tocantins. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, p. 15-21, jan./abr. 2003.

REIS, M.; CASA, ; BIANCHIN,. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 37, p. 85-91, jun. 2011.

SABADIN, P. K. **Mapeamento de qtls aplicações e perspectivas**. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, 2010.

SANTOS, G. R. D.; et al. Danos causados por doenças fúngicas no arroz. **Bragantia**, Campinas, v. 70, p. 869-875, jul. 2011.

SATO, H. QTL analysis of brown spot resistance in rice (*Oryza sativa* L.). **Breeding Science**, p. 93-96, mar. 2008.

SCHEUERMANN, K. K.; REBELO, A. M.; HICKEL, E. R. Avaliação do potencial antifúngico do óleo essencial de *cymbopogon citratus* para controle da antracnose em goiabeira. In: XIX ENPOS, 1, 2017, Pelotas. **Resumo...** Pelotas: UFPEL, 2017. p. 543-546.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. D. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, p. 129-137, 2000.

SEIXAS, P. T. L.; et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, 2011.

SENRA, J. F. B.. **Mapeamento e validação de QTLs para isoflavonas em linhagens endogâmicas recombinantes de soja**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Porto Alegre, 2013.

SILVA, O. F. Dados Conjunturais - EMBRAPA. **Dados conjunturais**, 2018. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 25 Setembro. 2018.

SILVA, P. R. D. et al. Validação de marcadores moleculares associados a genes de resistência à ferrugem-da-folha do trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1357-1363, out. 2008.

SOSBAI. Arroz irrigado: Recomendações da Pesquisa Para o Sul do Brasil. In: XXXI REUNIÃO TÉCNICA DO ARROZ IRRIGADO, 1, 2014, Bento Gonçalves. **Boletim...** Bento Gonçalves: UFSM, 2016. p 1-197.

SOUZA, I. R. P. D.; et al. Validação de QTLs para Resistência à Virose Mosaico Comum em Milho. In: XXIX Congresso nacional de milho e sorgo, 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: ABMS, 2012. p. 33-39.

Srinivasachary, S. Resistance to rice sheath blight (*Rhizoctonia solani* Kühn). **Euphytica**, p. 1-122, nov. 2010.

Turchetto-Zolet, A. C.; et al. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 179 p

TOLEDO, E. R. D. et al. Mapeamento de qtls : uma abordagem bayesiana. **Revista Bras. Biometria**, São Paulo, v. 26, p. 107-114. 2008.

TOPPA, E. V. B.; JADOSK, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, p. 1-5, mai. 2012.

TUPICH, F. L. B.; et al. Impacto do controle do mofo-branco com fluazinam na produtividade da soja no Sul. **Summa Phytopathol**, v. 43, p. 145-150, fev. 2017.

VERGARA, B.S. **A farming's primer on growing**. Los Baños: IRRI, 1979. 221p.

VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A QTLs DE RESISTÊNCIA À MANCHA PARDA E À QUEIMA DA BAINHA EM ARROZ

SOARES, Sandy da Silva¹; NUNES, Camila de Marillac²; ABREU, Aluana Gonçalves

¹Aluna do curso de Agronomia do Centro Universitário de Goiás – Uni ANHANGUERA. ² Professora orientadora Dra. do Curso de Agronomia do Centro Universitário de Goiás – Uni-ANHANGUERA. ³ Pesquisadora orientadora Dra. da Embrapa Arroz e Feijão.

O arroz (*Oryza sativa*) é o segundo cereal mais consumido no mundo, sendo a principal fonte de energia para mais da metade da população mundial. No Brasil, devido ao clima favorável, as principais doenças da cultura são de origem fúngicas. *Magnaphorte oryzae* é o agente causal da principal doença de arroz, a brusone, porém, doenças consideradas secundárias como a mancha parda (*Bipolaris oryzae*) e a queima da bainha (*Rhizoctonia solani*) já causam danos de níveis significativos nas lavouras. Assim, o objetivo do trabalho foi otimizar marcadores moleculares associados a QTL para resistência à mancha parda e queima da bainha em genótipos de arroz pertencentes ao BAG da Embrapa Arroz e Feijão. Foram identificados 26 marcadores SSR, previamente identificados na literatura, associados a QTL de resistência à essas doenças. Os marcadores foram testados em 27 genótipos contrastantes, ou seja, resistentes e suscetíveis. Para a otimização e posteriormente validação dos marcadores, foi feito teste de temperatura de anelamento dos primers e quantidade de reação para cada marcador. Após a extração de DNA, as amostras foram amplificadas através da PCR e a visualização das mesmas foi feita através da eletroforese em gel de agarose. Em relação ao processo de otimização, a temperatura de anelamento variou $\pm 4^{\circ}\text{C}$ em relação a temperatura descrita na literatura. Foram identificados sete marcadores monomórficos e 14 marcadores polimórficos, dos quais oito possuem até três alelos. Os marcadores polimórficos poderão ser utilizados na próxima etapa do trabalho que será verificar se existe associação dos alelos desses marcadores com resistência às doenças.

PALAVRAS-CHAVE: Marcadores microsatélites. Doenças secundárias. *Rhizoctonia solani*. *Bipolaris oryzae*