



<b>Evento</b>	XXI FEIRA DE INICIAÇÃO À INOVAÇÃO E AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO – FINOVA/2012
<b>Ano</b>	2012
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Desenvolvimento de metodologia para identificação da presença de genes de resistência a herbicidas em plantas, sementes e produtos de arroz
<b>Autores</b>	CÁTIA MENEGUZZI ALDO MEROTTO JUNIOR Catarine Markus VALMIR KUPAS
<b>Orientador</b>	ALDO MEROTTO JUNIOR

Autor : Cátia Meneguzzi  
Orientador: Aldo Merotto Junior

Desenvolvimento de metodologia para identificação da presença de genes de resistência a herbicidas em plantas, sementes e produtos de arroz

O arroz a é a planta daninha mais importante para a cultura do arroz irrigado. O arroz vermelho corresponde a biótipos silvestres da própria espécie *Oryza sativa* que se caracterizam como daninhos por apresentarem elevada dormência e degrane de sementes e alta competição interespecífica. O alto degrane de sementes impede a colheita do arroz vermelho e dificulta sua colheita e utilização de forma semelhante ao que acontece com o arroz cultivado. O controle do arroz vermelho com a utilização de herbicidas torna-se impossibilitado, pois o arroz vermelho pertence à mesma espécie que o arroz cultivado. O desenvolvimento de cultivares de arroz resistente a herbicidas do grupo químico das imidazolinonas permitiu o controle seletivo do arroz vermelho, resultando em elevados ganhos de rendimento de grãos da cultura do arroz no RS. No entanto o uso contínuo de herbicidas imidazolinonas resultou na evolução de biótipos de arroz vermelho resistente a estes herbicidas. Assim, apesar de representar uma grande vantagem para a cultura do arroz, alguns problemas também podem acontecer em decorrência da utilização de cultivares resistentes aos herbicidas imidazolinonas principalmente relacionadas à ocorrência de fluxo gênico e a processo de seleção independente que resultam na evolução de arroz vermelho resistente a herbicidas. Neste sentido existe a necessidade de diagnóstico rápido e preciso para a identificação da resistência a herbicidas em arroz vermelho para a identificação de lavouras com este problema, em sistemas de desenvolvimento de cultivares e de produção de sementes, e na certificação de grãos para exportação. O objetivo deste trabalho é desenvolver metodologia expedita e precisa para a identificação de gene de resistência a herbicidas inibidores da enzima ALS em arroz através da metodologia de PCR em tempo real.

O material vegetal constituiu das cultivares de arroz IRGA 422 CL, SATOR CL, PUITA INTA CL, as quais são resistentes aos herbicidas inibidores de ALS devido às mutações dos gene ALS G<sub>624</sub>E, S<sub>653</sub>D e A<sub>122</sub>T respectivamente, da cultivar de arroz IRGA 417 a qual é suscetível a esses herbicidas e de um ecótipo de arroz vermelho resistente a herbicidas (AV 75). As amostras de DNA genômico utilizadas neste estudo foram obtidas de aproximadamente 150 mg de tecido foliar. A extração de DNA genômico foi realizada conforme a metodologia CTAB modificado e a quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro e em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e padrão lambda de 100 a 1000 pb. Posteriormente o DNA foi diluído em TE 1x e armazenado a -5°C a uma concentração de 25ng/μl. A presença de

mutações no gene ALS relacionadas às cultivares de arroz resistente a imidazolinonas utilizadas no Rio Grande do Sul foi identificada através de marcadores moleculares SNP. A análise das reações foi realizada através de PCR em tempo real pelo sistema SyberGreen. As reações foram realizadas em volume final de 20 µl por poço, sendo 10 µl da reação a qual é composta 2 µl de tampão 10 X, 0,5 µl dNTPs, 1,2 µl de solução de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µl DE SYBR Green, 0,2 µl de ROX Reference Dye, 0,1 Taq Platinum e 0,4 µl da combinação de primers forward e reverse e sendo 10 µl de DNA. As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de 95°C durante 5 minutos seguido de uma sequência de 40 ciclos : iniciando em 94°C por 15 segundos, 60°C por 10 segundos, 72°C por 15 segundos e 60° por 35 segundos, neste passo foi capturada a fluorescência. Ao fim foi adicionado um ciclo final de dissociação. A comparação foi realizada com base nas amostras contendo unicamente DNA da cultivar resistente ou suscetível a herbicidas imidazolinonas. As amostras das cultivares utilizadas foram avaliadas em relação à amplificação com os três primers SNP específicos para cada mutação do gene ALS relacionada a resistência a herbicidas imidazolinonas em cultivares de arroz.

Os resultados obtidos indicaram que primers SNP desenhados para a identificação das mutações ALS G<sub>624</sub>E, S<sub>653</sub>D, presentes nas cultivares IRGA 422 CL e SATOR CL são efetivos com o sistema SyberGreen em qRT-PCR. Por outro lado, o primer SNP relacionado a identificação da mutação do gene ALS A<sub>122</sub>T, presente na cultivar PUITÁ INTA CL não apresentou discriminação entre as cultivares avaliadas através da metodologia de PCR em tempo real. Este estudo estará tendo continuidade através da avaliação de outros primers relacionados a esta mutação do gene ALS e da avaliação através do sistema de amplificação de PCR em tempo real TaqMan.