

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE ARROZ (*Oryza sativa*) DETERMINADA POR MARCADORES SSR

Jacqueline Barbosa Nascimento¹, Tereza Cristina de Oliveira Borba², Raquel Neves de Mello³, José Alexandre de Freitas Barrigossi⁴, José Francisco da Silva Martins⁵, Paulo Marçal Fernandes⁶

Palavras-chave: marcador molecular, microssatélites e diversidade.

INTRODUÇÃO

O uso de marcadores moleculares em arroz tem possibilitado o estudo da diversidade genética dentro da espécie, a identificação de subespécies, caracterização molecular de cultivares e a construção de mapas para a identificação de características importantes como a resistência a doenças e insetos-praga (LOPES, 2002). Em arroz os marcadores moleculares do tipo SSR estão distribuídos por todo o genoma e possuem um alto conteúdo de informação de polimorfismo. Essa classe de marcadores tem sido utilizada para caracterizar a diversidade genética de cultivares e variedades tradicionais de arroz em alguns países como no Brasil (BRONDANI ET AL., 2006; BORBA ET AL., 2009a) na Argentina (GIARROCCO ET AL., 2007), na Venezuela (HERRERA ET AL., 2008) e na Índia (PERVAIZ ET AL., 2009). Este trabalho teve como objetivo analisar, através de marcadores SSR, a diversidade genética dos acessos de arroz pertencentes à Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 34 acessos de arroz pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão (BAG) e componentes da Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa (CNAE). Os acessos são integrantes dos estratos que compreendem as linhagens e cultivares introduzidas (LCI), linhagens e cultivares brasileiras (LCB) e variedades tradicionais (VT) de arroz denominadas de "Canelas de Ferro". As amostras de tecido foliar de quatro plantas por acesso foram coletadas para a caracterização da diversidade genética a extração e quantificação do DNA genômico foram conduzidas pelo método descrito por Doyle & Doyle (1987) citado por Brondani et al. (2002).

Para a análise molecular foi utilizado um painel composto por 24 marcadores SSR previamente desenvolvidos e publicados na literatura (BORBA ET AL., 2009a). As reações de PCR seguiram o seguinte padrão de amplificação para um volume final de 5 µL: 2,5 µL de Master Mix; 0,5 µL de Q solution; 0,1 µL de água RNase free (Kit comercial Qiagen® Multiplex PCR); 0,8 a 1,0 µL dos *primers* SSR (10 µM) e 1,0 µL de DNA (3 ng/ µL). O termociclador utilizado para a condução das reações de PCR foi GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e as condições das amplificações seguiram a seguinte programação: uma etapa de 95°C/15 segundos, seguida de 40 ciclos de 94°C/30 segundos, 56°C/90 segundos e 72°C/90 segundos e uma etapa final de 72°C por dez minutos. Os produtos amplificados foram diluídos para a obtenção de sinais uniformes e definidos no

¹Doutoranda em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Rodovia Goiânia - Nova Veneza, km zero. Campus Samambaia, Goiânia, GO, nascimentojb@hotmail.com

²Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, tereza@cnpaf.embrapa.br

³Doutora em Agronomia, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, raquelmello@cnpaf.embrapa.br

⁴Doutor em Entomologia Agrícola, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, alex@cnpaf.embrapa.br

⁵Doutor em Entomologia, Pesquisador, Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, martins@cnpaf.embrapa.br

⁶Prof. e Doutor em Entomologia, Universidade Federal de Goiás, Rodovia Goiânia - Nova Veneza, km zero. Campus Samambaia, Goiânia, GO, pmarta@terra.com.br

analisador de fragmento automático ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Os alelos foram identificados pelo *software* GeneMapper 3.5 (*Applied Biosystems*) utilizando o padrão GeneScan™ 500 Rox™ Size Standard (*Applied Biosystems*).

A determinação do número de alelos exclusivos (ou privados) foi obtida através do programa *Genetic Data Analysis* (GDA) (LEWIS & ZAYKIN, 2002). O número médio de alelos/loco e os valores de PIC (*Polymorphism Information Content*) foram calculados utilizando-se o programa *PowerMarker* versão 3.23 (LIU & MUSE, 2005). O programa *Identity* (WAGNER & SEFC, 1999) foi usado para obter a probabilidade de identidade (PI). A análise fatorial de correspondência (AFC) foi obtida através do programa *Genetix* versão 4.03 (BELKHIR ET AL., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 24 marcadores SSR utilizados para a caracterização molecular dos acessos de arroz identificaram 243 alelos variando de quatro (RM 171) a 28 (RM 14), com média de 10,12 alelos/marcador. Entre os alelos identificados, 92 (38%) foram privados ou exclusivos, ou seja, observados em um único acesso (Figura 1). O marcador que detectou o maior número de alelos privados foi o RM 14 com treze alelos (Figura 1). O PIC variou de 0,10 (RM 171) a 0,87 (OG 106), com média de 0,63. O conjunto de marcadores utilizados neste trabalho identificou uma probabilidade de identidade (P.I.) combinada de $1,00 \times 10^{-18}$. Este valor corresponde à probabilidade de se encontrar, ao acaso, dois indivíduos com o mesmo genótipo, quando analisados por um conjunto de marcadores.

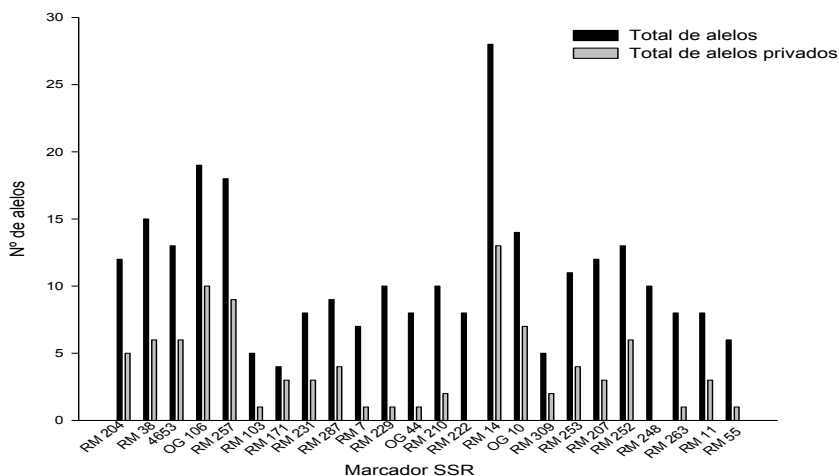


Figura 1. Número de alelos (totais e privados) detectados com 24 marcadores SSR nos diferentes acessos de arroz.

A distribuição espacial da variabilidade genética do conjunto de acessos analisados pode ser visualizada na Figura 2, através da análise fatorial de correspondência (AFC). Verificou-se que as cultivares introduzidas TKM 6 e IR 42 distinguiram-se geneticamente dos demais acessos. As demais cultivares e linhagens introduzidas formaram um grupo com maior similaridade genética entre si, da mesma maneira, as variedades tradicionais e as cultivares brasileiras encontraram-se mais próximas.

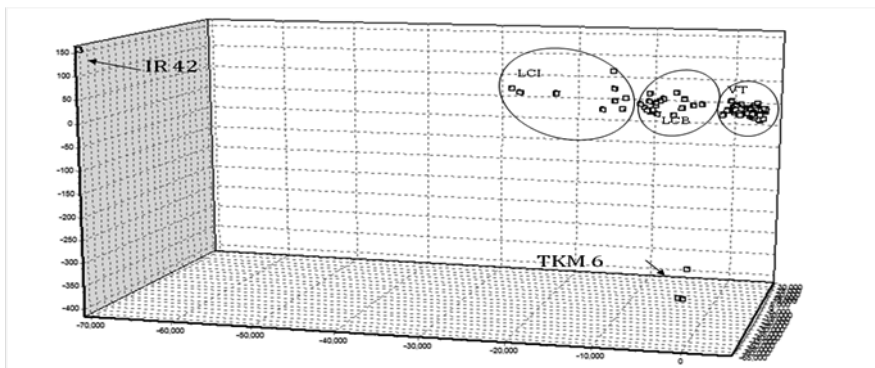


Figura 2. Análise fatorial de correspondência (AFC) demonstrando o padrão de distribuição espacial da variabilidade genética dos 34 acessos analisados.

Em comparação com estudos que analisaram a divergência existente em germoplasma de arroz, o número médio de alelos por loco (10,12) e PIC (0,63) encontrados neste estudo foram superiores aos detectado por Giarrocco et al. (2007) e Pervaiz et al. (2009) que detectaram 8,4 e 4,5 alelos/locos e PIC igual a 0,69 e 0,60, respectivamente. Brondani et al. (2006) e Borba et al. (2009b) encontraram um número médio de alelos por loco de 14,7 e 12,4 e valores de PIC iguais a 0,73 e 0,75, respectivamente. O número de alelos privados encontrado neste trabalho foi superior ao encontrado em Borba et al. (2009a) que obteve 41 alelos privados ou exclusivos. As informações quanto à presença de alelos privados podem ser úteis na identificação de genótipos com variabilidade genética exclusiva, ou seja, com caracteres expressos diferencialmente.

Na análise fatorial de correspondência foi observada a divisão de grupos distintos e este fato pode está relacionada com a origem dos acessos, já que estes são oriundos de programas de melhoramento de arroz do exterior e do Brasil. A verificação da presença de variabilidade genética expressiva entre os 34 acessos fornece indícios de que estes podem ser utilizados pelos programas de melhoramento do arroz no Brasil como fonte de variabilidade.

CONCLUSÃO

A utilização de marcadores SSR com marcação fluorescente foi bastante eficaz para a análise da diversidade genética dos acessos de arroz avaliados. Essa análise permitiu a identificação de acessos de arroz mais divergentes geneticamente, que poderão ser utilizados como fonte de variabilidade para a ampliação da base genética do arroz melhorado brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. **Genetix** Version 4.05.2. Université de Montpellier. 2001. Disponível em: <<http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>>
- BORBA, T. C. de O.; BRONDANI, R. V.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C. Microsatellite marker-mediated analysis of the Embrapa rice core collection genetic diversity. **Genetica**, v. 137, p.293-304, 2009a.
- BORBA, T. C. de O.; MENDES, C. dos A.; GUIMARÃES, E. P.; BRUNES, T. O.; FONSECA, J. R.; BRONDANI, R. V.; BRONDANI, C. Genetic variability of brazilian rice landraces determined by SSR markers. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, p.706-712, 2009b.

BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; FERREIRA, M. E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.**, v. 104, p.1192- 1203, 2002.

BRONDANI, C.; BORBA, T. C. de O.; RANGEL, P. N.; BRONDANI, R. P. V. Determination of genetic variability of traditional varieties of Brazilian rice using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p.676-684, 2006.

GIARROCCO, L. E.; MARASSI, M. A.; SALERNO, G. L. Assessment of the genetic diversity in Argentine rice cultivars with SSR markers. **Crop Science**, v. 47, p. 853-860, 2007.

HERRERA, T. G.; DUQUE, D. P.; Almeida, I. P.; Núñez, G. T., Pieter, A. J.; Martinez, C. P.; Tohme, J. M. Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 5, p.1-14, 2008.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0, 2002. Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

LIU, K.; MUSE, S.V. **Power marker**: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics** v.21, p.2128–2129, 2005.

LOPES, M. C. B. **Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de arroz irrigado**. 2002. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

PERVAIZ, Z. H.; RABBANI, M. A.; PEARCE, S. R.; MALIK, S. A. Determination of genetic variability of Asian rice (*Oryza sativa* L.) varieties using microsatellite markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 5641-5651, 2009.

WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. **IDENTITY 1.0**. Center for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna, 1999.