

VARIABILIDADE GENÉTICA EM GERMOPLASMA DE ARROZ UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES SSR

Daisy Leticia Ramirez Monzón¹; Raquel Kneib²; Naciele Marini³; Caroline Marques Castro⁴; Ariano Martins de Magalhães Jr.⁵; Luciano Carlos da Maia⁶

Palavras-chave: características fenotípicas; *Oryza sativa* L.; melhoramento genético.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais cultivados, sendo considerado o alimento básico mais importante no mundo, demandando assim o aumento dos atuais níveis de produtividade da cultura (FAN, 2011).

A maior parte do arroz produzido é proveniente de variedades modernas altamente produtivas, no entanto, variedades tradicionais mantidas em bancos de germoplasma apresentam grande importância como recursos genéticos para ampliação da base genética em programas de melhoramento. Essas variedades tradicionais são valiosos recursos por conterem variabilidade genética e, ao mesmo tempo, complementarem o *pool* gênico das cultivares melhoradas recentemente. Estas representam um estágio intermediário da domesticação dos ancestrais silvestres e as variedades modernas, e servem de reservatório da variabilidade (LONDO et al., 2006).

O arroz irrigado no Brasil era constituído, na maior parte da base genética dos programas de melhoramento, até pouco tempo, por sete variedades: DeoGeo Woo Gen, Cina, Lati Sail, I GeoTze, MongChimVang A, Belle Patna e Tetep (RANGEL et al., 1996; NASCIMENTO, 2008). Porém, Montalvânet al. (1998) alertaram sobre o estreitamento da base genética das cultivares modernas de arroz. Sendo assim, é necessário priorizar a conservação, bem como melhorar a manutenção e utilização dos banco de germoplasma.

As informações sobre a variabilidade e estrutura do germoplasma são essenciais para a seleção de características importantes para a realização de cruzamentos, e também para a identificar genótipos que contém alelos de importância para o melhoramento de plantas (GARRIS et al., 2005). Essa variabilidade expressa-se, entre outras formas, através do grande número de variedades que as espécies cultivadas apresentam (MÜHLEN et al., 2000). Na avaliação da variabilidade genética, os marcadores microssatélites tem sido utilizados com sucesso e são considerados ideais para a caracterização molecular de recursos genéticos por serem marcadores co-dominantes, abundantes, multialélicos, altamente polimórficos e com grande eficiência (VARSHNEY et al., 2005).

Considerando a necessidade e a importância do estudo da variabilidade genética, este trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética de 151 genótipos de arroz disponíveis no Banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado, utilizando marcadores SSR.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado. Foram utilizados 151 genótipos de arroz pertencente ao Banco de germoplasma da Embrapa. As sementes foram acondicionadas em rolos de papel

¹ D. L. M. Ramirez, Engenheira Agrônoma, M.Sc., Doutoranda, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96.010-900, Capão de Leão, RS, Brasil, daisyrami@gmail.com.

² Doutoranda, Doutoranda, Universidade Federal de Pelotas.

³ Doutora, Pós doutoranda, Embrapa Clima Temperado.

⁴ Doutora, Pesquisadora, Embrapa Clima Temperado.

⁵ Doutor, Pesquisador, Embrapa Clima Temperado.

⁶ Doutor, Professor Universidade Federal de Pelotas.

germinador, umedecidas com água ultrapura. Posteriormente foram mantidas em câmara de germinação (BOD) a 26 °C, por um período de sete dias (BRASIL, 2009). Após este período foram coletadas amostras do tecido folhar para extração de DNA genômico. As extrações de DNA foram realizadas utilizando o método CTAB modificado (DOYLE; DOYLE, 1990). A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1% comparados com o Marcador Lambda/Hind III (Invitrogen) de peso molecular conhecido, tendo sido as amostras diluídas para a concentração de 10 ng/μl.

A seleção dos marcadores SSR foi realizada baseada na *Polymorphism Information Content* (PIC) de cada loci, tamanho de amplificação e distribuição, considerando os 12 cromossomos do arroz. Foram selecionados nove loci microssatélites (TEMNYKH et al., 2000) sendo, posteriormente, analisados, conforme metodologia proposta (ZHU et al., 2004; WANKHADE et al., 2010; RAJENDRAN et al., 2012).

As condições de amplificação foram as seguintes: 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 a 61 °C por 1 min e 72 °C por 5 min. Para a detecção de polimorfismo alélico foi efetuada eletroforese em géis de poliacrilamida 6%. Os produtos amplificados foram visualizados através de coloração do gel com nitrato de prata e o tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado comparando-se sua posição no gel em relação à posição das bandas de tamanho definido de um marcador padrão de peso molecular de 10pb DNA Ladder (Invitrogen). Foi realizada a análise de correspondência múltipla (MCA) utilizando a ferramenta estatística SAS (SAS Institute, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que um total de 41 alelos foram detectados com os nove *loci* SSR nos 151 genótipos estudados. O número de alelos por *locus* variou de dois (RM184) a sete (RM157A), com uma média de 4,55 alelos por *locus*. Na Tabela 1 podem ser visualizados os alelos obtidos nos diferentes *loci*. O *locus* RM157A detectou o maior número, equivalente a sete alelos no conjunto de genótipos estudados, seguido por RM286 com seis alelos, enquanto o menor número foi detectado em RM184, com apenas dois alelos diferentes identificados.

Os alelos mais frequentes neste estudo foram detectados nos *loci* RM184, RM161, RM172 e RM341. Sete alelos (17,07%) apresentaram-se pouco frequentes por genótipos RM341, RM 57A, RM161, RM103, RM152 e RM286, variando de oito a um genótipo por *locus* SSR. Os genótipos Mogi e Oro apresentaram um alelo nos *loci* RM157A e RM286. Relatos sobre a cultivar Oro ressaltam que esta foi selecionada a partir de um arroz que era semeado inicialmente no Chile, sendo que sua origem está, provavelmente, nas primeiras variedades introduzidas da Europa (AGIRRE, et al., 2005), podendo a característica apresentar-se somente nesses dois genótipos.

Tabela 1. Tamanho de alelo (TA) e número de genótipos (N^o) observados nos 151 genótipos analisados, para os nove *loci* SSR. Embrapa, UFPel/CGF/Pelotas, 2015.

Alelos	CR 2		CR 3		CR 5		CR 6		CR 7		CR 8		CR 10		CR 11		CR 12		
	RM 341	RM 157A	RM 161	RM 103	RM 172	RM 152	RM 184	RM 286	RM 19	TA	N ^o G	TA	N ^o G	TA	N ^o G	TA	N ^o G	TA	N ^o G
A	153	95	135	4	195	117	343	18	179	17	154	6	232	117	119	77	259	49	
B	161	34	144	44	196	4	346	75	185	111	160	11	239	63	133	10	261	80	
C	178	6	147	8	199	35	350	44	182	40	165	53			137	20	264	33	
D	186	19	148	21	204	13	354	18			168	15			138	29	282	10	
E	190	106	153	57			359	3			154	6			146	27			
F			160	23											152	1			
G			162	1															
Total de alelo	260		158		169		158		168		167		180		164		172		

Na análise de correspondência múltipla (MCA) (Figura 1), observa-se que no quadrante I são agrupados os genótipos preferencialmente de origem *indica*, sendo encontrados genótipos de importância para o melhoramento como Cica4, Cica7, Cica9 e Cica8. Estes genótipos representam, aproximadamente, 90% dos genótipos desenvolvidos no Brasil e

agrupado neste quadrante devido ao fato de seu genitor, Dawn, também se encontrar no mesmo quadrante. Em análise de genealogia realizada por Raimondiet al. (2014), foi observado um nível significativo de parentesco do IRGA 411 com os genótipos comerciais de arroz lançados pela Embrapa e IRGA.

CONCLUSÃO

Os nove *loci* utilizados são eficientes e apresentam alto polimorfismo entre os genótipos estudados, observando uma grande variabilidade genética nos 151 genótipos do banco ativo de germoplasma da Embrapa.

AGRADECIMENTOS

CAPES e Embrapa Clima Temperado pela concessão de bolsa ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, C.; ALVARADO, R.; HINRICHSEN, P. Identificación de Cultivares y Líneas de Mejoramiento de Arroz de Chile Mediante Amplificación de Fragmentos Polimórficos (AFLP). **Agricultura Técnica**, v. 65, n.4, p.356-369, December 2005.
- FAN, S. Global population versus foodproduction. **Rice Today**, Los Baños, v. 10, n. 4, p. 50, 2011.
- GARRIS, A. J., T. H. TAI, J. COBURN, S. KRESOVICH AND S. MCCOUCH Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics Society of America**. n.169, p.1631-1638, March 2005.
- IRGA. **Levantamento de Safra: 2013/14**. Avaliação de semeadura. Disponível em: http://www.irga.rs.gov.br/upload/20140224154739cultivares_regionais_2013_14. Acessado: 20 jan. 2015
- LONDO, J.P.; CHIANG, Y.C.; HUNG, K.H.; CHIANG, T.Y.; SCHAAL, B.A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryzarufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 103, p. 9578-9583, June 2006.
- MONTALVÁN, R.; DESTRO, D.; SILVA, E. F.; MONTAÑO, J.C. Genetic base of Brazilian upland rice cultivars. **Journal of Genetics & Breeding**, v. 52, p. 203-209, Sep1998.
- MÜHLEN, G.S.; MARTINS, P.S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores moleculares de DNA. **ScientiaAgricola**. v.57, p.319-328, June 2000.
- NASCIMENTO, W.F. DO. **Caracterização morfoagronômica de acessos de arroz (*Oryza sativa* L.) de terras altas**. 2008. 83f. Dissertação Universidade Federal de Pernambuco.
- RAIMONDI, J.V.; MARSCHALEK, R.; NODARI, O. Genetic base ofpaddy rice cultivarsofsouthernBrazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnonology**. v. 14, p.194-199, October 2014.
- RAJEMDRAN, N.; MUKHERJEE, L.; REDDY, K.K.; SHASHIDHAR, H.E. DNA fingerprinting and estimation of genetic diversity among hybrid rice parental lines (*Oryza sativa* L.) using simple sequence repeats (*SSR*) markers. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**. v.4, n.11, p.169-174, December 2012.
- SAS Institute. SAS/STAT guide for personal computers,Version 8.0.**SAS Inst.**, Cary, NC. 2000.
- TEMNYKH, S.; PARK, W.D.; AYRES, N.; CARTINHOOUR, S.; HAUCK, N.; LIPOVICH, L.; CHO, Y.G.; ISHII, T.Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 697-712, May 2000.
- VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**. v.23, p.48-55, January 2005.
- ZHU, M.; WANG,L.; PAN,Q. Identification and Characterization of a New Blast Resistance Gene Located on Rice Chr. 1 Through Linkage and Differential Analyses. **Phytopathology**. v. 94, n. 5, May 2004.