

Determinação da Distância Genética de Variedades Tradicionais de Arroz Brasileiras

Clistiane dos Anjos Mendes¹, Paulo Hideo Nakano Rangei², Rosana Pereira Vianello Brondani², Jaime Roberto Fonseca², Cláudio Brondani²

Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é utilizado como alimento por mais da metade da população mundial. No Brasil constitui alimento básico, contribuindo como uma importante fonte de carboidratos e aminoácidos essenciais. Com o passar dos anos, os avanços conseguidos através do melhoramento genético acarretaram o estreitamento da base genética da cultura. A utilização de germoplasma de ampla base genética, como as variedades tradicionais (VT), pelo programa de melhoramento genético do arroz permite a introdução de novos alelos e o surgimento de novas combinações alélicas, resultando na redução da vulnerabilidade a doenças e insetos e maior estabilidade da produção [1]. A caracterização agronômica juntamente a caracterização molecular dos recursos genéticos, permite que genes potencialmente úteis sejam identificados e posteriormente utilizados em programas de melhoramento. Este trabalho tem como objetivo a caracterização por marcadores SSR de variedades tradicionais de arroz coletadas na Paraíba, Ceará e Goiás, como parte do esforço para ampliar a variabilidade genética existente no conjunto de acessos da Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa (CNAE).

Materiais e Métodos

A. Material Vegetal e Extração de DNA

Foram analisados 64 acessos de variedades tradicionais de arroz, coletadas nos Estados da Paraíba (22 acessos), Ceará (26) e Goiás (16), pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás. A extração do DNA genômico de 188 amostras foi conduzida em *bulk* de quatro plantas, seguindo o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia [2].

C. Análise Molecular e Estatística

Foram selecionados 14 marcadores microssatélites (Tabela 1), com temperatura de anelamento de 56°C e altos valores de PIC (*polymorphism information content*). As reações de PCR foram conduzidas utilizando volume final de 15 µl, sendo: 4,3 µl de cada primer (0,9 µM), 1,5 µl de tampão 10x, 1,3 µl de DMSO (50%), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5unidades/µl), 1,3 µl de DNTP (2,5 mM) e 5 µl do DNA (3ng/µl) Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em géis de poli-acrilamida desnaturante a 6% corados com nitrato de prata [3]. Os dados de genotipagem correspondentes ao tamanho dos alelos foram obtidos pela comparação visual das bandas dos acessos com o *Ladder* padrão de 10 pares de base (pb). Na identificação de números de alelos, alelos privados, e determinação do PIC foi utilizado o programa Genetic Data Analysis (GDA) [4]. O dendrograma foi construído utilizando o programa NTSYS [5] a partir da matriz de frequências alélicas obtida pelo programa FSTAT [6], a distância genética utilizada foi a de Rogers modificada por Wright (Rogers-W) [7]. A estabilidade dos agrupamentos, visualizados no dendrograma, foi testada pelo procedimento de reamostragem com 1000 randomizações utilizando o programa Bood v 3.04 [8]. A análise fatorial de correspondência (AFC) foi obtida pelo programa Genetix [9]. O programa Identity [10] foi utilizado para determinação dos valores de probabilidade de identidade (PI) e número de indivíduos idênticos.

Resultados e Discussão

Foi obtido um total de 172 alelos, com média de 12,3 alelos/loco, variando de seis (OG 44) a 20 (OG 61), valores próximos dos já encontrados para VT brasileiras de arroz [11]. Entre os alelos amostrados, 41 eram alelos privados. Os acessos Lajeado e Agulhinha de 5 meses, obtiveram o maior número de alelos privados (quatro) (Tabela 1). O PIC

¹. Bolsista da Embrapa Arroz e Feijão e graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, CEP 75375-000. E-mail: clisagroma@hotmail.com

². Pesquisador Doutor, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, CEP 75375-000.

variou de 0,53 (OG 44) a 0,87 (RM 253), com uma média de 0,74 (Tabela 1). A análise do grupo de 64 acessos produziu uma distância genética de Rogers-W média de 0.71. No dendrograma houve a formação de três grupos de similaridade e o acesso Agulhinha de 5 meses ficou individualizado, e será objeto de estudo do programa de pré-melhoramento da Embrapa, por sua maior diversidade genética (Fig. 1). O agrupamento I foi constituído por VTs coletadas na Paraíba; o II por VTs do Ceará e o III por VTs de Goiás, com algumas exceções, marcadas por asterisco na Figura 1. Este resultado demonstra que a adaptação de VTs a condições específicas de cultivo são refletidas diretamente na variabilidade alélica possível de ser detectada por análise de SSRs, e que a coleta de VTs de arroz deve continuar a ser realizada em todos os Estados brasileiros, a fim de amostrar o máximo da variabilidade genética disponível para a conservação em bancos de germoplasma, e para uso dos programas brasileiros de melhoramento genético do arroz. De acordo com a distribuição espacial obtida pela AFC, os grupos I e II foram representados em sua maioria por acessos do sistema irrigado (89%), e o grupo III por acessos do sistema de sequeiro (88%) (Fig. 2). Este resultado demonstra que VTs de diferentes sistemas de cultivo podem ser agrupadas, devido a complexidade genética resultante do processo de formação destas VTs, ou seja, durante anos, houve mistura de sementes, fluxo gênico, deriva genética, etc. que contribuíram para a obtenção de combinações alélicas específicas. Estes resultados tem ajudado a estabelecer prioridades para a coleta de germoplasma e para o programa de pré-melhoramento de arroz da Embrapa.

Agradecimentos

A Embrapa Arroz e Feijão pela concessão da bolsa de estágio.

Referências

- [1] BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N. 2003. Utilização de marcadores moleculares em programas de ampliação da base genética de espécies cultivadas. Documento 155. Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão.
- [2] FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.; Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 1998. Brasília, Embrapa, p 121-125.
- [3] CRESTE, B.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, p. 299-306.
- [4] LEWIS, P. O., and Zaykin, D. Genetic Data Analysis : Programa de Computador para análises de dados alélicos. Version 1.0 (d16c) Homepage: <http://alleyn.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- [5] ROHLF, F. J. NTSYSpc. Version 2.02g. 1989.
- [6] GOUDET, J. FSTAT. Version 2.9.3.2. Homepage: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- [7] WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. 1978. Chicago, University of Chicago Press, v.4.
- [8] COELHO, A. S. G.; Bood. Version 3.04. 2000.
- [9] BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. GENETIX. Université de Montpellier Version 4.05.2. 2001. Available in: <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>. Accessed in :05 maio 2004.
- [10] HORST, W. W.; KRISTINA, M. 1999. Identity 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna.
- [11] BRONDANI, C.; BORBA, T. C. O.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V. Determination of genetic variability of traditional varieties of Brazilian rice using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 4, pag. 676-684. 2006.

Tabela 1 . Resultado da análise com 14 marcadores microssatélites (SSR) em 64 acessos de variedades tradicionais brasileiras. CR: localização no cromossomo, NA: Número de alelos, PIC: Polymorphism information content, PI: probabilidade de identidade.

Marcador	CR	NA	PIC	PI	Alelos Privados*
RM1	1	16	0.74	0.144	Comum (0.5; 106), Lajeado (0.125; 102), Arroz Caqui (0.14; 104)
RM5	1	7	0.77	0.163	-
RM13	5	10	0.66	0.204	Arroz da região (0.08; 146), Vermelho 6 (0.13; 158)
RM204	6	14	0.84	0.079	Agulhinha de 5 meses (0.4; 132), Arroz Vermelho/ Pé de ema (0.9; 110), Arroz Maranhão (0.1; 126)
RM207	2	15	0.87	0.057	Agulhinha de 5 meses (1; 114), Cica (0.34; 148), Agulhinha (0.05; 142), Vermelho 2 (0.07; 162), Arroz Maranhão (0.2; 124)
RM222	10	12	0.78	0.127	Vermelho 10 (0.62; 202), Vermelho com mistura (0.21; 214), IR com mistura (0.21; 226), Lajeado (0.25; 204)
RM224	11	10	0.80	0.126	-
RM229	11	13	0.77	0.147	IR - 8 com mistura (0.21; 142), Arroz Branco 2 (0.1; 146), Comum (0.07; 106), Lajeado (0.125, 114)
RM253	6	9	0.70	0.224	Arroz Branco 3 (0.3; 142), Lajeado (0.62; 146)
RM311	10	8	0.61	0.236	Cica (0.07; 182)
OG44	3	6	0.53	0.290	Arroz Branco 3 (0.7; 172)
OG61	5	20	0.87	0.053	Agulhinha de 5 meses 2 (1; 156), Agulhinha (0.04; 130), Lajeado (0.25; 132)
OG106	9	18	0.73	0.167	Agulhinha de 5 meses (0.8; 228), Arroz Comum Branco (0.125; 234), Desconhecido Comum (0.08; 238), Lajeado (0.16; 260, 0.66; 240), Arroz Maranhão (0.1; 214), Arroz Misturado (0.22; 200)
4653	12	14	0.72	0.169	Agulhinha de 5 meses (0.2; 164), Cica (0.11; 144), Arroz da região (0.25; 140), Mochotó (0.07; 104), Caqui 3 (0.1; 142), Vermelho (0.1; 146)
Total	-	172	-	1.2 10 ⁻¹²	-

* Em parentêses estão a frequência dos alelos e o tamanho da banda em pares de bases; (CR) Cromossomo; (NA) Número de alelos.

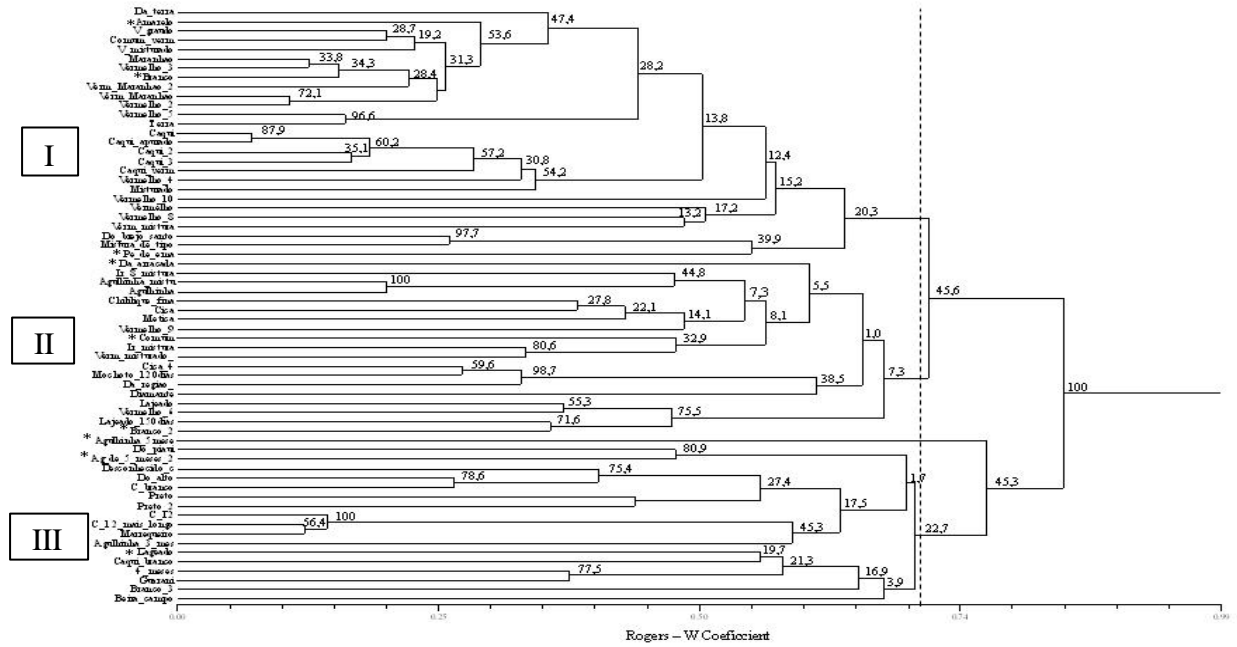


Figura 1. Dendrograma resultante da análise das 64 variedades tradicionais de arroz utilizando o coeficiente de distância Rogers-W. A linha pontilhada representa a distância de Rogers-W média (0,71). Os valores indicados nos nós são referentes ao bootstrap. I, II e III: Grupos de similaridade genética (*) acessos com sistema de cultivo diferente de cada grupo.

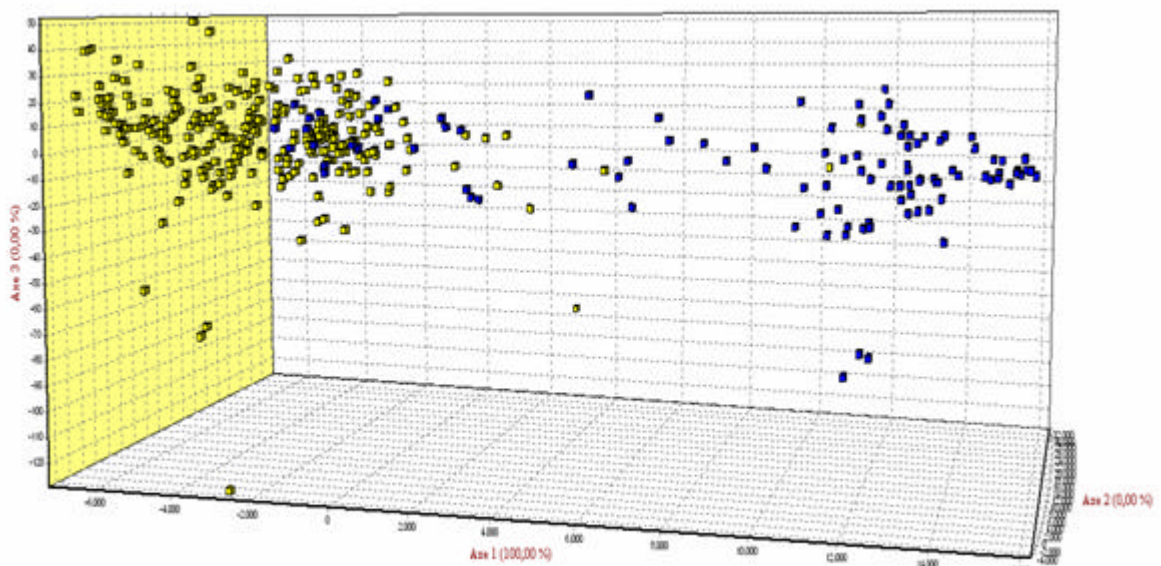


Figura 2. Análise fatorial de correspondência dos acessos de variedades tradicionais de arroz. Em amarelo, acessos do sistema de cultivo irrigado e em azul, sistema de cultivo de sequeiro.