

# ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE VARIEDADES TRADICIONAIS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES <sup>1</sup>

Tereza Cristina de Oliveira Borba <sup>2</sup>, Maria Imaculada Zucchi <sup>3</sup>, Rosana Vianello Brondani <sup>4</sup>, Paulo Hideo Nakano Rangel<sup>4</sup>, Mara Rúbia Magalhães, Claudio Brondani<sup>4</sup>

**Palavras-Chave:** Recursos genéticos, Coleção nuclear, base genética, produtividade.

## INTRODUÇÃO

O Brasil produz anualmente, aproximadamente 11,5 milhões de toneladas de arroz, quantidade muito próxima de seu consumo interno. Instabilidade climática e ocorrência de doenças tem ocasionado queda na produção, e a conseqüente necessidade de importação deste cereal. Se considerarmos ainda o aumento da população a uma taxa de 2% ao ano, conclui-se que há necessidade de se procurar novas alternativas para aumentar a produção brasileira de arroz, apenas para suprir o mercado interno. A principal causa apontada para a estagnação dos patamares de produtividade é a utilização de genitores aparentados no programa de melhoramento genético (Rangel et al., 1994), o que tem reduzido as chances de aparecimento de novas combinações gênicas favoráveis para características relacionadas a produção. Deste modo, o uso de parentais geneticamente divergentes em cruzamentos, poderia favorecer o desenvolvimento de linhagens com elevado potencial produtivo e com base genética mais ampla. Este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética através de marcadores moleculares SSR em uma amostra de variedades tradicionais oriundas de coletas, conduzidas entre os anos de 1978 e 1996, em lavouras de pequenos agricultores no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material vegetal:** foram analisados 192 acessos de arroz oriundos de expedições de coleta realizadas em vários estados do Brasil, durante o período de 1978 a 1996 (Tabela 1). Os genótipos foram selecionados com base nos nomes idênticos, que apresentavam em diversos locais de coleta. O DNA de cada acesso foi obtido de um grupo de 10 indivíduos, reunidos em bulk, ou seja analisou-se uma amostra que continha o DNA de 10 plantas por acesso.

---

<sup>1</sup> Pesquisa em desenvolvimento com suporte financeiro do CNPq e Embrapa Arroz e Feijão

<sup>2</sup> Bolsista do CNPq. Embrapa Arroz e Feijão. E-mail: [oliveiraborba@yahoo.com.br](mailto:oliveiraborba@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Estudante de Doutorado da ESALQ-USP. E-mail: [mizucchi@carpa.ciagri.usp.br](mailto:mizucchi@carpa.ciagri.usp.br)

<sup>4</sup> Pesquisadores da Embrapa Arroz e Feijão. caixa Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: [rosanavb@cnpaf.embrapa.br](mailto:rosanavb@cnpaf.embrapa.br) ; [brondani@cnpaf.embrapa.br](mailto:brondani@cnpaf.embrapa.br) ; [phrangel@cnpaf.embrapa.br](mailto:phrangel@cnpaf.embrapa.br)

Análise com marcadores SSR: Cada reação de volume final de 15 µL continha: 3,55 µL de H<sub>2</sub>O estéril, 1,5 µL de tampão 10x, 1,3 µL de dNTP (2,5 mM), 1,3 µL de DMSO (50%), 2,15 µL de primer (0,9 µM), 0,2 µL de enzima Taq polimerase (5 unidades/ µL) e 5 µL de DNA (3ng/ µL). As reações foram conduzidas no termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando o seguinte perfil de temperaturas: 94°C/ 5 minutos, 29 ciclos de 94°C/ 1 minuto, 56°C/ 1 minuto, 72°C/ 1 minuto, e 72°C/ 7 minutos. O produto da reação de SSR foi submetido a eletroforese em gel de acrilamida 4% corada com nitrato de prata.

Marcadores Moleculares utilizados: Inicialmente foram avaliados 28 marcadores microssatélites altamente informativos (heterozigosidade esperada maior que 80%), em uma amostra formada por 4 acessos de arroz. Destes, foram selecionados 12 marcadores SSR para análise dos 192 acessos, baseados no seu polimorfismo e localização cromossômica (um marcador para cada cromossomo): RM9, RM11, RM22, RM 204, RM207, RM223, RM229, RM247, RM252, RM310 (Chen *et al.*, 1997), e OG61, OG106 (Brondani *et al.*, 2001). A partir do número e frequência de alelos, foram estimados o número de alelos restritos de cada acesso, a heterozigosidade observada (H<sub>o</sub>) e a diversidade gênica (H<sub>e</sub>), a matriz de distância genética e o dendrograma baseado nesta matriz. Para estas análises foram utilizados os softwares GDA, TFPGA, FSTAT e NTSYS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

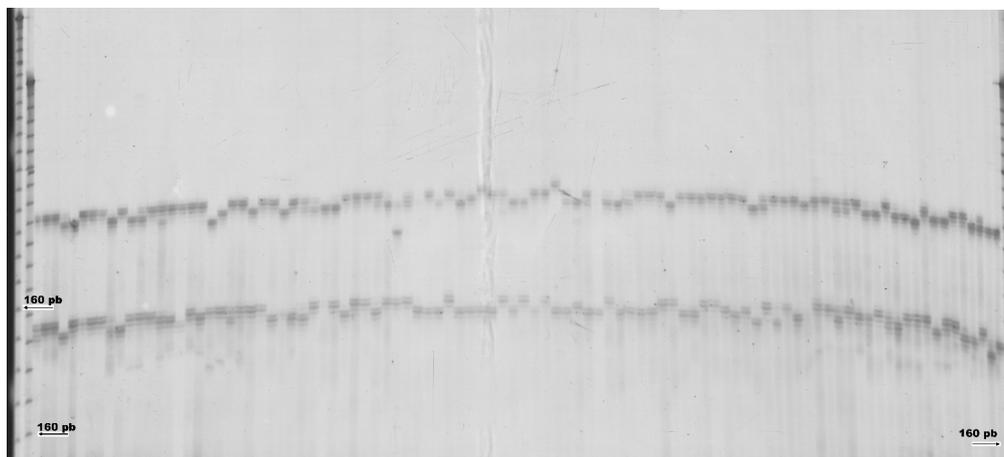
Os 12 locos SSR selecionados revelaram 175 alelos para os 192 acessos analisados. O número de alelos por loco variou de 6 (RM 22, Figura 1) a 22 alelos (OG 61 e OG 106), com uma média de 14,6 alelos por loco.

Como medida do potencial informativo dos marcadores microssatélites, calculou-se o índice de heterozigosidade esperada (PIC – “Polymorphism Information Content”), o qual variou entre 0,33 (RM 252) e 0,94 (OG 106), sendo o valor médio encontrado de 0,73 (Tabela 2). Os valores da heterozigosidade esperada (H<sub>e</sub>) foram maiores que os da heterozigosidade observada (H<sub>o</sub>), indicando um excesso de homozigotos, conforme o esperado para uma espécie de hábito reprodutivo preferencialmente autógamo como o arroz.

Para os acessos que apresentaram bulks em heterozigose para 4 ou mais marcadores SSR (Tabela 3), os 10 indivíduos componentes do bulk foram analisados individualmente com estes marcadores, a fim de verificar a segregação alélica dentro de cada acesso. Desta forma, a análise molecular foi restringida aos acessos geneticamente mais variáveis. Da mesma forma, os indivíduos pertencentes a bulks de acessos que apresentaram 3 alelos por loco SSR também foram genotipados.

**Tabela 1-** Local de coleta e nome comum das 192 variedades tradicionais de arroz analisadas.

Nome Comum	Unidade Federativa	Nome Comum	Unidade Federativa	Nome Comum	Unidade Federativa	Nome Comum	Unidade Federativa
3 Meses	GO	Bico Torto	RS	Cutião	PI	Meruim II	AC
3 Meses Amarelo	GO	Boliviano	MT	Cutião Vermelho	MA	Mineiro	AC
3 Meses Curto	MG	Branco	GO	De Maio	MS	Miúdo Branco	MA
3 Meses Precoce	GO	Branco 3 Meses	MG	De Morro	ES	Montanha	AM
4 Meses	GO	Branco 4 Meses	GO	Dez Anos	MT	Montanha Potrão	MS
4 Meses Antigo	MT	Branco Longo Precoce	SP	Doidão	ES	Mucuim	PI
60 Dias	GO	Branquinho	BA	Douradão	GO	Muruim	AM
90 Dias	AL	Brejeiro	MG	Douradinho	AC	Nanicão	ES
100 Dias	GO	Brejeiro	MG	Escrevim	PI	Neném	MA
Abril	RJ	Buriti	PI	Farroupilha	RS	Nenezinho Branco	MA
Agulha	CE	Buriti Vermelho	MA	Ferrão Preto	GO	Noventinha	MS
Agulha	MT	Cacho Grande	MT	Ferrão Preto Precoce	SP	Pacholinha	RJ
Agulha	MT	Caiana Grande	AL	Ferrugem	MT	Paga Dívida	PI
Agulha Amarelo	AM	Cana Roxa	GO	Ferrujão	MS	Palha Murcha	PI
Agulha Vermelho	CE	Cana Roxa Vermelha	MA	Goianinho	MS	Patrão	RO
Agulhão	AL	Canela de Aço	AC	Goiano	MA	Paulista	AC
Agulhão	RR	Canela de Ferro	AC	Grão de Ouro	GO	Peludo	GO
Agulhão	RO	Carijó	GO	Guaira	GO	Pindorama	GO
Agulhão	RO	Carioca	RJ	Guaira Amarelo	GO	Pingo de Ouro	PI
Agulhinha	AC	Carioquinha	GO	Guaira Branco	GO	Prata	CE
Agulhinha Amarelo	MS	Carioquinha Amarelo	GO	Guapa	RO	Prata Ligeiro	CE
Agulhinha Anão	RO	Carioquinha Areia	GO	IAC Produtor	MS	Prata Roxa	MG
Agulhinha do Paraguai	MT	Carioquinha Vermelho	GO	IAC 1246	RO	Pratão	MT
Agulhinha Vermelho	RR	Carolina	PI	IAC 47	MS	Pratão	RO
Amarelão	MS	Carolina Bico Preto	MS	IAC 25 Branco	PI	Pratão	MT
Amarelão 90 Dias	MS	Carolina Longo	MS	Iguapé	GO	Pratão 4 Meses	AM
Amarelão Bico Preto	AM	Casado	MA	IR-8	PI	Pratão Precoce	GO
Amarelão Bico Preto 3 Meses	MT	Casado Ligeiro	PI	IR 8 do Padre	PI	Pratinha	GO
Amarelão Precoce	SP	Casca Branca	MG	Jaguari	AM	Precoce	BA
Amarelinho	GO	Catetão	MT	Japonês	RS	Preto	RO
Amarelo	AM	Catetinho	MG	Japonês	CE	Rabo de Carneiro	GO
Amarelo Bico Preto	GO	Cateto	MT	Japonês Claro	RO	Samambaia	ES
Amarelo Branco	SC	Cateto Amarelo	PR	Lageado	PI	Saquarema	PI
Amarelo Precoce	SP	Cateto Bico Preto	SP	Ligeirinho	PI	Serra Azul	MG
Anão	CE	Cateto Seda	SP	Ligeiro	MA	Sta América	MT
Anão	AL	Chatão	AM	Ligeiro Vermelho	PI	Sta América	GO
Anãozinho	TO	Chatão Vermelho	AM	Macaba Ligeiro	PI	Talo Roxo	PB
Bacaba	PI	Chatinho	AL	Macaba Maranhense	PI	Tomba Morro	MG
Bambu	RO	Chatinho Branco	SE	Macaba Miúdo	PI	Toro	PB
Barriga Branca	MG	Chifre de Veado	MS	Macapa	PI	Venez Branco ou Prata	MG
Batatais	PR	Chorinho	MG	Mangote	RJ	Vermelhão Taiano	RR
Beira Campo	MT	Chorinho Americano	MG	Maranhão	PI	Vermelhinho	PI
Bico Ganga	GO	Chorinho Apículo Escuro	MG	Maranhão Branco	PI	Vermelhinho 3 Meses	MT
Bico Preto	AC	Come Cru	RR	Maranhense	PI	Vermelho	AC
Bico Preto Cana Roxa	MS	Come Cru	PI	Matão	MG	Zebu	PI
Bico Preto Roxo	MA	Come Cru Branco	MA	Mato Grosso	PI	Zebu Branco	MA
Bico Roxo	BA	Comprido	GO	Meruim	AC	Zebu Ligeiro	PI
Bico Roxo Branco	GO	Comum	GO	Meruim Dourado	CE	Zebu Pingo d'água	RR



**Figura 1** – Padrão de amplificação do marcador RM 22 para os 192 acessos de *Oryza sativa*. Linha superior: acessos 1 a 96, linha inferior: acessos 97 a 192. Marcador de peso molecular: Ladder 10 pb.

**Tabela 2** – Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em 192 acessos de *Oryza sativa*, utilizando marcadores microsatélites: número de alelos;  $H_e$  (heterozigosidade esperada) e  $H_o$  (heterozigosidade observada).

Marcador SSR	Nº de alelos	$H_e$	$H_o$
RM 9	17	0,8217	0,0250
RM 11	14	0,6199	0,0568
RM 22	6	0,6006	0,0286
RM 204	17	0,5418	0,0404
RM 207	14	0,7533	0,0313
RM 223	10	0,8158	0,0605
RM 229	9	0,7943	0,0156
RM 247	17	0,8321	0,0094
RM 252	11	0,3340	0,0132
RM 304	16	0,8620	0,0069
OG 61	22	0,8872	0,0603
OG 106	22	0,9390	0,0748
Média	14,58	0,733	0,035

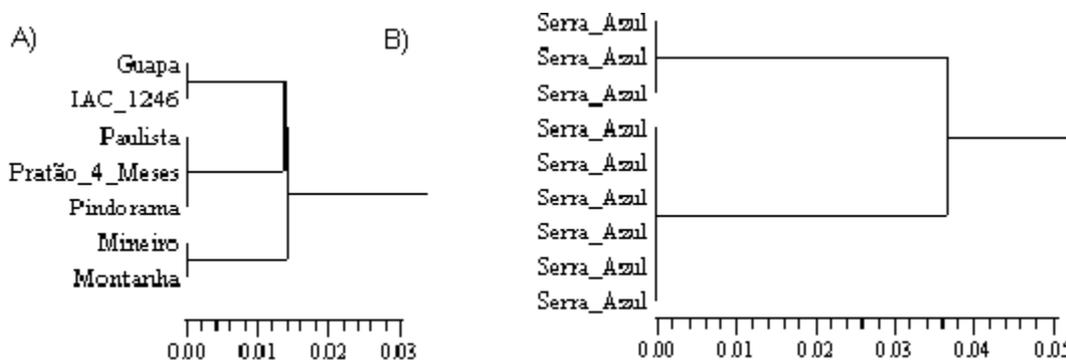
O dendrograma foi obtido a partir dos dados da matriz de distância genética J&C (Jukes & Cantor, 1969), que apresentou o maior índice de correlação cofenética (0,78) em comparação a outros coeficientes de distância genética utilizados. Nenhum dos acessos com mesmo nome comum, oriundos de diferentes Estados, foram geneticamente idênticos. Isto foi devido a grande variação encontrada dentro dos acessos, mesmo utilizando apenas uma amostra de 10 indivíduos, que constituíram os bulks. Esta diferença pode ser decorrente de um processo que pode incluir mistura de sementes e fecundação cruzada com outras cultivares plantadas em áreas adjacentes. Este processo, submetido à seleção local após vários anos de cultivo, pode fornecer uma nova identidade a uma variedade tradicional, geneticamente divergente da variedade que possua o mesmo nome, e que

esteja sendo cultivada em outro ambiente. Assim, mesmo o Brasil não sendo o centro de origem da espécie *O. sativa*, as condições ambientais locais podem ser fatores importantes para determinar o grau de variabilidade genética entre acessos de arroz coletados, o que corrobora a utilização de dados geográficos como critério para montagem da coleção nuclear do arroz (Abadie et al., 2001). As maiores distâncias genéticas encontradas foram 0,218 entre os acessos 60 dias e Goiano, e 0,203 entre os acessos 60 dias e Come Cru Branco. A distância média encontrada entre os 192 acessos foi de 0,115, superior à distância média encontrada de 0,08, obtida entre 43 cultivares comerciais de arroz (dados não publicados), ou seja, variedades tradicionais ainda mantém variabilidade genética suficiente para viabilizar sua utilização no programa de melhoramento visando a ampliação da base genética de novas cultivares de arroz. No dendrograma, foram identificados acessos com nomes distintos, mas geneticamente semelhantes (Figura 2A), assim como indivíduos que compunham o mesmo bulk sendo geneticamente distintos (Figura 2B).

**Tabela 3** – Bulk aberto para os acessos que apresentaram heterozigose para 4 ou mais locos SSRs ou 3 alelos por loco.

Acessos	Loco SSR
Agulha	RM 204, RM 207, RM 223, RM 229, RM 247, RM 252, OG 61
Bico Preto*	RM 11, RM 223, RM 252, OG 61, OG 106
Chatinho	RM9, RM 207, RM229, RM 247, RM 252
Chorinho*	RM 247, OG 61, OG 106
Come Cru Branco	RM 9, RM 11, OG 61, OG 106
De Maio	RM 11, RM 207, RM 223, RM 252
Doidão*	RM 207, RM 223
Japonês Claro	RM 9, RM 11, RM 304, OG 106
Macaba Marenhense	RM 9, RM 11, RM 22, RM 223, OG 106
Mato Grosso	RM 22, RM 207, OG 61, OG 106
Meruim II	RM 9, RM 11, RM 22, RM 223, RM 229
Japonês	RM 11, RM 207, RM 229, RM 247, RM 252, OG 61, OG 106
Prata Roxa*	RM 207, RM 229, RM 247, RM 252, RM 304, OG 61, OG 106
Agulhão	RM 9, RM 207, RM 223, OG 106
Serra Azul	RM 9, RM 11, RM 223
Venez Branco ou Prata*	RM 11, RM 207, RM 229, RM 247, RM 252, OG 61, OG 106

(\*) Acessos com 3 alelos por loco.



**Figura 2** - Dois fragmentos do dendrograma construído com 192 acessos de arroz baseado na distância genética utilizando o coeficiente J&C para 12 marcadores SSRs. A) Exemplo de acessos com nomes diferentes e geneticamente idênticos; B) Exemplo de acessos pertencentes ao mesmo bulk, com grau variável de diversidade genética.

## CONCLUSÕES

- 1) Variedades tradicionais devem ser utilizadas como genitores do programa de melhoramento do arroz, por representarem um grupo de genótipos adaptados as mais variadas condições ambientais brasileiras, e por serem fontes de variabilidade genética para o melhoramento.
- 2) O nome comum não é um bom descritor da identidade e variabilidade genética de variedades tradicionais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIE, T.E., CORDEIRO, C.M.T., FONSECA, J.R., FREIRE, M.S., ALVES, R.B.N., BURLE, M.L., BRONDANI, C., RANGEL, P.H.N., CASTRO, E. DA M., SILVA, H.T. 2001. **Desenvolvendo uma coleção nuclear de arroz para o Brasil**. In: Anais da VII Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz. Embrapa, Santo Antônio de Goiás. p. 259-261.
- BRONDANI, C., BRONDANI, R.P.V., RANGEL, P.H.N., FERREIRA, M.E. 2001. **Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *O. glumaepatula* x *O. sativa***. Hereditas. 134: 59-71.
- CHEN, X., TEMNYKH, S., XU, Y., CHO Y.G., MACCOUCH, S. R. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L). Theoretical and Applied Genetics 95: 553-567.

JUKES, T.H. & CANTOR, C.R. 1969. Evolution in protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.) Mammalian Protein Metabolism. Academic Press. New York., p.21-123.

RANGEL, P.H.N., GUIMARÃES, E.P., NEVES, P.C.F. 1994. Base genética das cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado do Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 31: 349-357.