

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS E CULTIVARES DA COLEÇÃO NUCLEAR BRASILEIRA DO ARROZ POR MARCADORES SSR

BORBA, Tereza Cristina de Oliveira¹; **BRONDANI**, Rosana Pereira Vianello²;
RANGEL, Paulo Hideo Nakano³; **BRONDANI**, Claudio⁴

Palavras-chave: arroz, recursos genéticos, marcadores moleculares

INTRODUÇÃO: A Coleção Nuclear Brasileira do Arroz (CNBA) possui 550 acessos divididos em três grupos: variedades tradicionais, genótipos melhorados no exterior, obtidos pelo intercâmbio de germoplasma, e genótipos melhorados brasileiros (Abadie et al., 2005). A importância da CNBA reside no fato de representar, em um número reduzido de genótipos, grande parte da variabilidade genética existente no Banco de Germoplasma da Embrapa, que possui aproximadamente 12.000 acessos de arroz. A caracterização da CNBA foi realizada através de marcadores moleculares e através da tomada de dados fenotípicos. A caracterização molecular dos acessos componentes da CNBA visou o fornecimento de informações precisas para auxiliar os melhoristas na escolha dos genótipos como genitores dos programas de pré-melhoramento e melhoramento. Para a caracterização molecular, utilizaram-se marcadores do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*). Esta classe de marcadores é considerada ideal à caracterização molecular de recursos genéticos, já que são marcadores codominantes, abundantes, multialélicos e altamente polimórficos. O objetivo deste trabalho foi determinar a variabilidade genética dos acessos que representam o pool gênico cultivado da CNBA, composto por linhagens e cultivares oriundas de programas de melhoramento genético do Brasil e exterior, por meio de marcadores SSR.

MATERIAL E MÉTODOS: Foram avaliados neste trabalho 242 acessos representativos do pool gênico cultivado do arroz, divididos em duas classes: a) Genótipos melhorados brasileiros, com 94 acessos, e b) Genótipos oriundos de programas de melhoramento de outros países, com 148 acessos. Cada grupo possui acessos dos tipos de cultivo irrigado e de terras altas. As extrações de DNA genômico foram realizadas segundo protocolo descrito por Brondani et al. (1998) e cada acesso foi representado por um *bulk* de quatro plantas. A caracterização molecular foi realizada com 86 marcadores SSR fluorescentes, disponíveis na literatura. Estes marcadores foram avaliados em 35 painéis multiplexes em seqüenciador automático de DNA, modelo ABI 3100. A escolha destes marcadores foi realizada em função da qualidade dos produtos amplificados, de sua localização no genoma e de seus valores de PIC (*Polymorphism Information Content*). A determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi feita com base na utilização de um marcador de massa molecular interno, marcado com o fluorocromo Cy-3.5 (corante cianina solúvel em água), desenvolvido de acordo com Brondani & Grattapaglia (2001). As análises realizadas utilizaram os seguintes *softwares*, GDA (*Genetic Data Analysis*) (Lewis & Zaykin, 2002) para a identificação de alelos privados e para a determinação do PIC de cada marcador, FSTAT (Goudet, 2001)

¹ Estudante de doutorado em Agronomia - UFG, Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, CEP 75375-000, Sto. Antônio de Goiás, GO. Fone (62) 35332128. E-mail: oliveiraborba@yahoo.com.br

² Bióloga, Doutora em Biologia Molecular., Embrapa Arroz e Feijão. Sto. Antônio de Goiás, GO

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biologia Melhoramento de Plantas, Embrapa Arroz e Feijão. Sto. Antônio de Goiás, GO

⁴ Orientador, Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biologia Molecular, Embrapa Arroz e Feijão. Sto. Antônio de Goiás, GO

para a construção de uma matriz de frequências alélicas, Identity (Wagner & Sefc, 1999) para a determinação dos acessos com genótipos idênticos e determinação da probabilidade de identidade, Genetix (Belkhir et al., 2001) para a visualização da distribuição espacial da variabilidade genética, e NTSYS (Rohlf, 1989), para a determinação da distância genética média de Rogers modificada por Wright (RW) (Wright, 1978).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O número de alelos identificados variou de 4 (RM484) a 30 (RM204), com uma média de 14,8 alelos/loco. Foram identificados 253 alelos privados, e o acesso que mais apresentou alelos diferenciados foi o BASMATI 370. Dentre os marcadores, os que identificaram um maior número de indivíduos com alelos privados foram o RM204 e o RM252. Os valores de PIC variaram de 0,19 (OG99) a 0,91 (OG106 e RM257), com uma média de 0,74. Coburn et al. (2002), Ni et al. (2002) e Lu et al. (2005), Jain et al. (2004), avaliando diferentes fontes de germoplasma de arroz com marcadores microssatélites, encontraram um número médio de alelos/loco em torno de sete, metade do valor encontrado neste trabalho. Estes mesmos autores encontraram valores de PIC médio de 0,6 e 0,46, respectivamente. Xu et al. (2004), que avaliaram 60 marcadores SSR em uma coleção de 236 acessos de arroz de diversos países, ou seja, uma amostra de germoplasma bastante semelhante ao germoplasma avaliado neste trabalho, encontraram, encontraram uma média de 12 alelos/loco e um PIC de 0,66. A obtenção de valores superiores, por meio do *set* de 86 marcadores, indica que o germoplasma avaliado neste trabalho possui maior variabilidade. Utilizando um *set* de 25 marcadores SSR, dois acessos foram identificados como duplicatas dentro da coleção (YN906UUL65 e IRAT142) (Borba et al., 2005). Porém, quando avaliados com o *set* de 86 marcadores, foram encontradas diferenças genéticas entre estes genótipos. Neste caso a avaliação molecular se tornou mais robusta à medida em que mais regiões genômicas foram avaliadas. A comparação dos valores encontrados para a probabilidade de identidade entre o *set* de 25 marcadores utilizado por Borba et al. (2005) com o *set* de 86 marcadores corrobora tal conclusão. Para o primeiro *set* de marcadores, o valor obtido para a probabilidade de se encontrar dois indivíduos iguais devido ao acaso foi de $1,55 \times 10^{-28}$, enquanto que para o segundo *set* este valor foi $5,5 \times 10^{-70}$. Quando divididos em relação ao tipo de cultivo, os acessos correspondentes ao tipo de cultivo irrigado apresentaram uma distância genética média RW de 0,81, enquanto que esta mesma distância para os acessos com tipo de cultivo de terras altas foi 0,75. Já quando divididos em relação à origem dos acessos, os provenientes de introduções apresentaram um valor para a distância genética média RW de 0,81, e os acessos provenientes de programas de melhoramento brasileiros apresentaram um valor de 0,76. A distância genética média RW foi de 0,82 para o grupo Introduzido com tipo de cultivo irrigado, 0,73 para o grupo Introduzido com tipo de cultivo de terras altas, 0,74 para o grupo Melhorado com tipo de cultivo irrigado e 0,71 para o grupo Melhorado com tipo de cultivo de terras altas. Confrontando-se os valores de distância genética média com a distribuição espacial da variabilidade genética dos grupos formados pela análise fatorial de correspondência (Figura 1), percebe-se que os dados se complementam, pois o grupo com maior distância genética média (Grupo Introduzido com tipo de cultivo irrigado) é o que apresenta maior distribuição espacial. Nesta análise, observa-se claramente a formação de quatro grupos distintos de genótipos, correspondentes aos grupos melhorados de terras altas e irrigados, e grupos introduzidos de terras altas e irrigados. A maior variabilidade genética encontrada

nos acessos componentes do grupo Introduzidos com tipo de cultivo irrigado em relação aos grupos melhorados brasileiros com tipo de cultivo irrigado e tipo de cultivo de terras altas indica que estes podem ser utilizados como genitores em cruzamentos para a ampliação da base genética de linhagens e cultivares elite brasileiras de arroz.

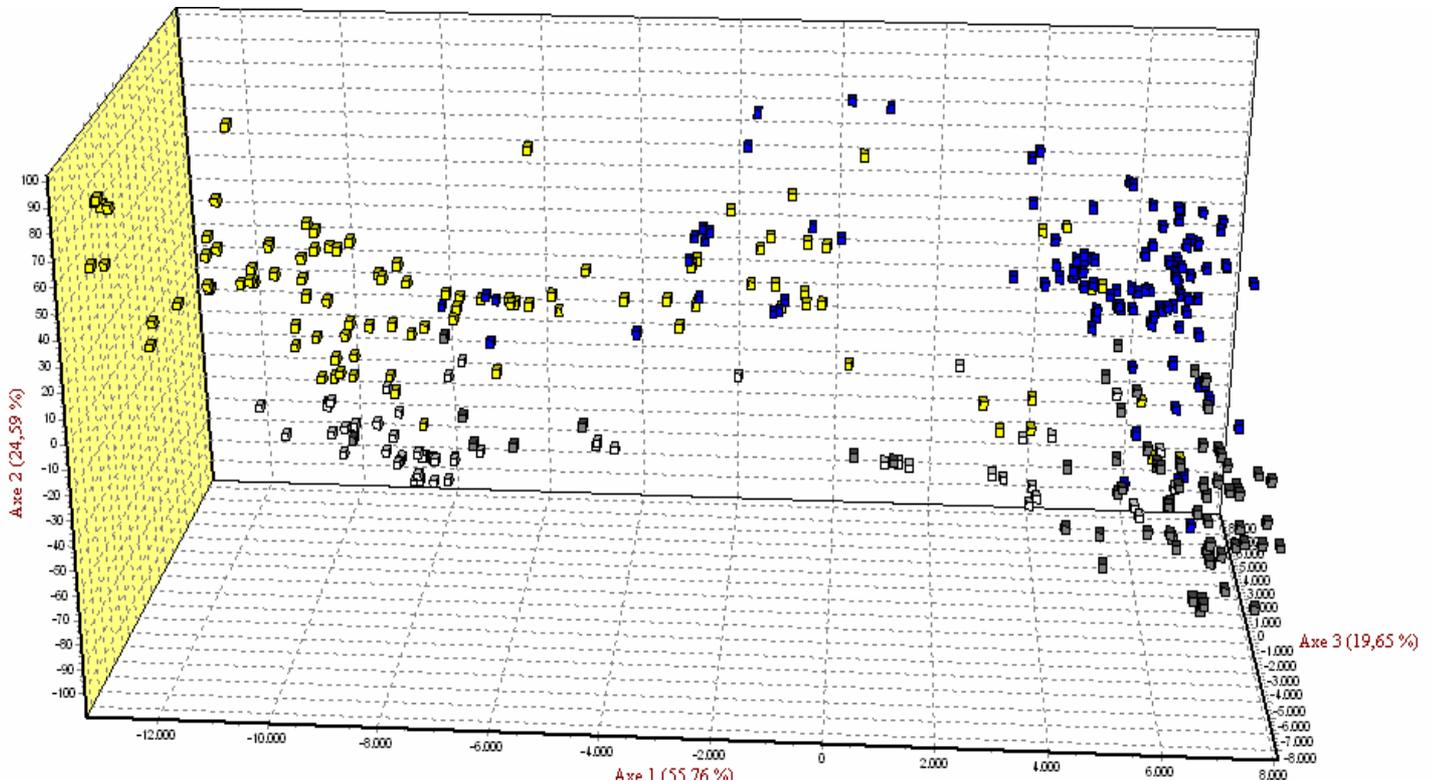


Figura 1. Distribuição espacial da variabilidade dos acessos componentes dos grupos de Genótipos Melhorados Brasileiros com tipo de cultivo irrigado (cor branca), Genótipos Melhorados Brasileiros com tipo de cultivo de terras altas (cor cinza), Genótipos Introduzidos com tipo de cultivo irrigado (cor amarela) e Genótipos Introduzidos com tipo de cultivo de terras altas (cor azul).

CONCLUSÕES: A caracterização molecular dos grupos de genótipos cultivados da CNBA permitiu avaliar com alto grau de detalhamento o nível da variabilidade genética existente nos diferentes grupos de genótipos. Esta análise permitiu identificar acessos mais divergentes geneticamente, pertencentes às classes de genótipos constituídas por linhagens e cultivares introduzidas, que serão utilizados como fonte de variabilidade genética para a ampliação da base genética do arroz melhorado brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, T.E.; CORDEIRO, C.M.T.; FONSECA, J.R.; ALVES, R.B.N.; BURLE, M.L.; BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; CASTRO, E.M.; SILVA, H.T.; FREIRE, M.S.; ZIMMERMANN, F.J.P.; MAGALHÃES, J.R. Construção de uma coleção nuclear de arroz para o Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. n.2, v.40, p.129-136, 2005.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. **GENETIX**. Université de Montpellier Version 4.05.2. 2001. Disponível em: <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>. Acesso em :05 mai 2004.

BORBA, T. C. O. ; BRONDANI, R. V. ; RANGEL, P. H. N. ; BRONDANI, C. Evaluation of the number and information content of fluorescent-labeled SSR markers for rice germplasm characterization. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. n.5, v.2, p.157-165, 2005.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.816-827, 1998.

BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**. v. 31, p. 802-810, 2001.

COBURN, J.R.; TEMNYKH, P.E.M.; McCOUCH, S. R. Design and application of microsatellite marker panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). **Crop Science**. v. 42, p. 2092-2099, 2002.

GOUDET, J. **FSTAT**. Version 2.9.3.2. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em 05 fev 2002.

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

JAIN, S.; JAIN, R. K.; McCOUCH, S. R. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 109, p. 965–977, 2004.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Acesso em 21 nov 2001.

LU, B. R.; ZHENG, K. L.; QIAN, H. R.; ZHUANG, J. Y. Genetic differentiation of wild relatives of rice as assessed by RFLP analysis. **Theoretical Applied Genetics**. v.106, p. 101-106, 2002.

NI, J.; COLOWIT, P.M.; MacKILL, D. Evaluation of genetic Diversity in rice using microsatellite markers. **Crop Science**. v. 42, p. 601-607, 2002.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc**. Version 2.02g. 1989.

XU, Y.; BEACHELL, H.; McCOUCH, S.R. A marker-based approach to broadening The genetic base of rice in the U.S.A. **Crop Science**. v. 44, p. 1947-1959, 2004.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. **Variability within and among natural populations**. Chicago, U. Chicago Press, 1978. v.4.