

1. ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE VARIEDADES ASIÁTICAS DE ARROZ (*ORYZA SATIVA* L) DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO

Cristyene Gonçalves Benicio¹, Tereza Cristina de Oliveira Borba², Rosana Pereira Vianello Brondani², Cláudio Brondani²

Palavras chaves: diversidade genética, germoplasma e *Oryza sativa* L.

INTRODUÇÃO

O arroz é considerado um dos alimentos mais importantes do mundo, sendo cultivado em mais de 100 países e consumido regularmente por mais de dois bilhões de pessoas (KUSH, 2005). Além disto, representa a principal fonte de proteína para milhões de pessoas em todo o planeta. No Brasil, o arroz é cultivado em todo o território nacional e ocupa posição de destaque, do ponto de vista econômico e social, entre as culturas anuais.

Os recursos genéticos de arroz são representados por espécies silvestres, populações locais e cultivares primitivas, cultivares obsoletas, linhagens provenientes de programas de melhoramento e cultivares modernas. Estima-se que existam mais de 400.000 acessos de arroz armazenados em bancos de germoplasma, e aproximadamente 75% destes estão conservados em seis bancos de germoplasma localizados em países asiáticos como China, Japão, Índia, Tailândia, Coreia e Filipinas (HAMILTON e RAYMOND, 2005). O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Arroz e Feijão, por exemplo, mantém um acervo de aproximadamente 11.500 acessos de arroz em condições controladas (12°C e 25% UR) (FREIRE et al., 2002).

Porém, grande parte dos bancos de germoplasma enfrenta problemas relacionados ao tamanho e a dificuldade para a organização destas (HINTUM et al., 2000). Algumas coleções se tornaram muito extensas, obstruindo, paradoxalmente, os seus propósitos, os quais são a conservação e utilização da diversidade genética que armazenam. Desta maneira, idealizou-se a criação de coleções núcleo, ou coleções nucleares, que representariam cerca de 70% da variabilidade original dos bancos em um número reduzido de acessos (FRANKEL, 1984). A Coleção Nuclear Brasileira do Arroz (CNBA), por exemplo, possui 550 acessos divididos em três estratos: variedades tradicionais, linhagens e cultivares brasileiras e linhagens e cultivares estrangeiras.

Uma das características mais importantes das coleções nucleares é a sua dinamicidade, que permite que novos acessos sejam incorporados ou excluídos mesmo após seu estabelecimento e validação (NASS 2001). Desta forma, caso sejam identificados acessos com características de interesse, não presentes na composição inicial da coleção, só é preciso a sua introdução no conjunto.

Entre as ferramentas disponíveis para a caracterização de acessos de germoplasma encontram-se os marcadores moleculares. Diversas classes estão disponíveis, porém os marcadores do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) são considerados ideais à caracterização molecular de recursos genéticos, já que são marcadores codominantes, abundantes, multialélicos e altamente polimórficos.

O objetivo deste trabalho foi o de caracterizar acessos asiáticos de arroz do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão para o aperfeiçoamento da CNAE (Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 144 acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Arroz e Feijão compreendendo variedades asiáticas de arroz. Para cada acesso obtiveram-se amostras de DNA de quatro indivíduos, analisou-se então cada acesso através de um bulk de plantas. Amostras das

¹ Estagiário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Arroz e Feijão e Aluno do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. CEP 74001-970, C.P. 131. E-mail: cristyene@gmail.com

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, GO.

sementes foram germinadas em bandejas, mantidas na casa de vegetação e após vinte dias transplantadas para área experimental localizada na Fazenda Palmital, da Embrapa Arroz e Feijão. Vinte dias após o transplante, foram coletadas amostras do tecido foliar de cada indivíduo. As extrações de DNA genômico foram realizadas segundo protocolo descrito por DOYLE e DOYLE (1987) e adaptado por GRATAPAGLIA et al. (1992). A concentração do DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1% por comparação visual com DNA-padrão do fago lambda (50 a 400 ng). Posteriormente a concentração das amostras foi ajustada para 3 ng/ul. Para a análise genética utilizaram-se sete marcadores SSR fluorescentes previamente desenvolvidos e publicados na literatura. Os produtos de PCR foram analisados em analisador automáticos de DNA, modelo ABI 3100 (Applied Biosystems) e os alelos foram identificados através do programa GeneMapper™ 3.5 (Applied Biosystems).

O número de alelos exclusivos foi obtido através do programa GDA (*Genetic Data Analysis*) (LEWIS e ZAYKIN, 2001), o número médio de alelos/loco, os valores de PIC (*Polymorphism Information Content*) e os índices de diversidade gênica foram calculados utilizando-se o programa PowerMarker (LIU e MUSE, 2005). A probabilidade de identidade foi obtida através do programa Identity (WAGNER e SEFC, 1999). A matriz de distância genética foi obtida a partir da distância de Rogers modificada por WRIGHT (1978), disponível no programa NTSys (ROHLF, 1989). O programa Structure (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado para testar uma possível estruturação genética dos acessos avaliados e a análise fatorial de correspondência foi obtida através do programa Genetix (BELKHIR et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos 144 acessos de arroz, através de sete marcadores SSR, identificou-se um total de 81 alelos. Entre os alelos, aproximadamente, 22% (18) foram privados, ou seja, identificados somente em um único acesso. O marcador que detectou o maior número de alelos privados foi o RM204 com oito. Os alelos privados foram identificados em aproximadamente 12% dos acessos analisados, com o acesso KEN LOC apresentando o maior número, dois alelos. O número de alelos por marcador variou de seis (RM171) a 21 (RM204), com uma média de 11,57 alelos/marcador. O valor médio de PIC foi de 0,74, variando de 0,65 (RM103) a 0,83 (RM204). A distância genética média de Rogers modificado por Wright foi de 0,66. A probabilidade de identidade (P.I.) combinada foi de $1,8 \times 10^{-6}$, este valor diz respeito à probabilidade de se encontrar, ao acaso, dois indivíduos ao acaso com o mesmo genótipo para determinado conjunto de locos.

Cada acesso foi representado por um bulk de DNA de quatro plantas, e entre os 144 acessos, aproximadamente 55% apresentaram ao menos um marcador SSR heterogêneo, ou seja, apresentaram mais de um alelo por marcador. Entre os acessos que apresentaram heterogeneidade, destacou-se o acesso IR 65251-19-1-B com heterogeneidade em todos os marcadores analisados (Figura 1). A presença de heterogeneidade pode ser explicada pela ocorrência de heterozigosidade residual (ALLARD, 1961) ou pela ocorrência de polinização cruzada com outro acesso, ou até mesmo pela combinação dos dois fatores. No conjunto de 144 acessos não foi identificada nenhuma evidência de estruturação populacional, apesar da indicação visual de estruturação através da análise de fatorial de correspondência (Figura 2).

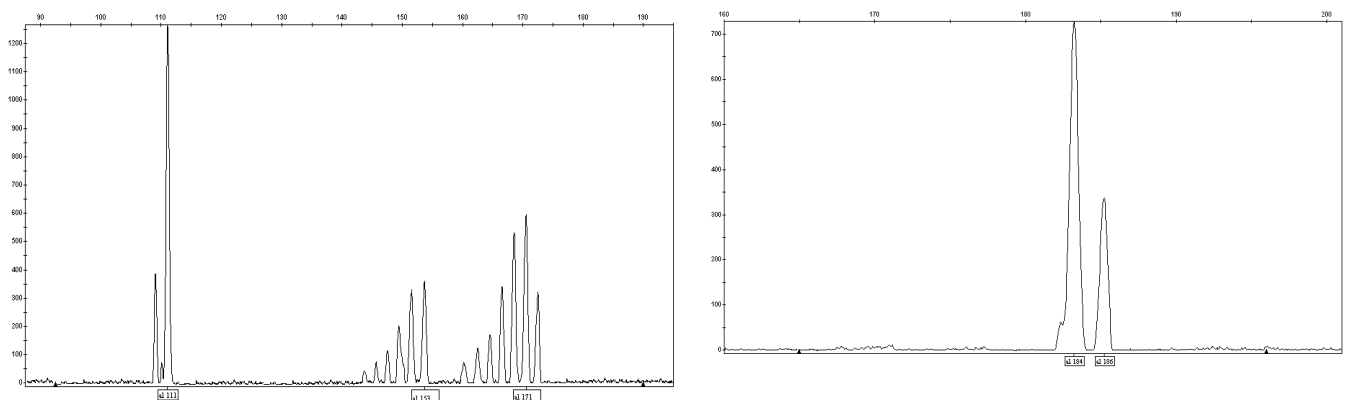


Figura 1. Perfil de amplificação dos marcadores RM204 e RM231 para o acesso IR 65251-19-1-B.

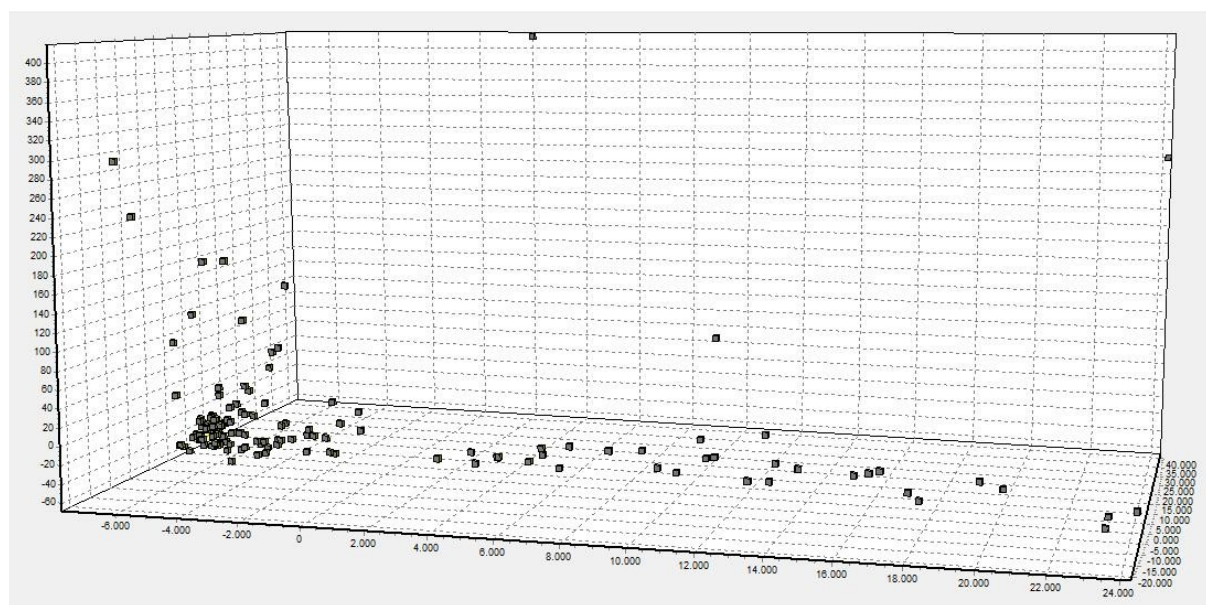


Figura 2. Análise fatorial de correspondência demonstrando o padrão da distribuição espacial da variabilidade genética dos 144 acessos analisados.

CONCLUSÃO

A caracterização molecular dos 144 acessos asiáticos indica a existência de grande variabilidade genética entre estes. A utilização de marcadores SSR permitiu a determinação da relação genética entre os acessos, além disto, possibilitou que importantes parâmetros genéticos fossem estimados, auxiliando a seleção de novos acessos a serem introduzidos na CNAE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD RW. Relationship between genetic diversity and consistency of performance in length environments. **Crop Science**. 1:127-133. 1961.
- BELKHIR K, BORSA P, CHIKHI L, RAUFASTE N, BONHOMME F. **Genetix Version 4.05.2**. Université de Montpellier. 2001. Disponível em: <<http://www.univmontp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>>. Acesso em: 05/05/04.
- DOYLE JJ, DOYLE JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 12: 13-15. 1987.
- FRANKEL OH. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: Arber W, Llimensee K, Peacock WJ, Starlinger P. Genetic manipulation: impact on man and society. **Cambridge University Press**. 161-170. 1984.
- FREIRE ADB, FREIRE MS, ZIMMERMANN FJP. Monitoramento de germoplasma de arroz em câmara de conservação. **Ciências e Agrotecnologia**. Lavras. 26: 943-948. 2002.
- GRATTAPAGLIA D, O'MALEY DM, SEDEROFF RR. Multiple applications of RAPD markers to genetic analysis of *eucalyptus* sp. In: **Proceedings of iufro international conference "breeding tropical trees"**. 132-137. 1992.
- HAMILTON RS, RAYMOND R. Toward a global strategy for the conservation of rice genetic resources. In: Toriyama K, Heong KL, Hardy B. Rice is life: scientific perspectives for the 21st century. **Proceedings of the world rice research conference**. Tsukuba, Japan, cd-rom, 47-49. 2005.

HINTUM THJLV, BROWN AHD, SPILLANE C, HODGKIN T. Core collections of plant genetic resources. **IPGRI**. 48p. 2000.

KHUSH GS. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. **Plant Molecular Biology**. 59:1-6. 2005.

LEWIS PO, ZAYKIN D. **Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>. Acesso em 02/06/09.

LIU K, MUSE S. **Powermarker: new genetic data analysis software**. Version 323. Free program distributed by the author over the internet. Disponível em: <http://www.powermarkernet>. Criado em: 2005.

NASS LL. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. Cap 02. 30-55. 2001.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**. 155: 945-959. 2000.

ROHLF FJ. **NTSYSpc**. Version 2.02g. 1989.

SINGH SP. Broadening the genetic base of common bean cultivars: review. **Crop Science**. 41: 1659-1675. 2001.

WAGNER HW, SEFC KM. **IDENTITY 1.0**. Center for applied genetics, University of agricultural sciences Vienna, 1999.

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