

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS MUTANTES DE ARROZ COM MARCADORES AFLP

Emilia Malone<sup>1</sup>, Daniel da Rosa Farias<sup>1</sup>, Juliana C. Branco<sup>1</sup>, Albina P. Bernardes<sup>1</sup>, Fernando I.F. Carvalho<sup>1</sup>, Antonio C. de Oliveira<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Genômica e Fitomelhoramento/FAEM/UFPEL, Campus Universitário s/n 3º Andar, c.p: 354, CEP: 96010-900. [emimalone@hotmail.com](mailto:emimalone@hotmail.com)

O arroz por ser uma espécie que apresenta um genoma pequeno, pelo desenvolvimento de mapas genéticos e físicos e recentemente com o sequenciamento completo do genoma, tem sido considerado uma espécie modelo para o melhoramento genético de gramíneas (GALE e DEVOS, 1998). Muitos dos problemas encontrados em programas de melhoramento associados à estimativa da expressão fenotípica de caracteres agronômicos estão sendo minimizados mediante a utilização das técnicas de biologia molecular que permitem realizar um diagnóstico dos indivíduos ao nível do DNA. Nos últimos anos, várias técnicas de marcadores moleculares tais como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) têm sido desenvolvidas e estão sendo amplamente utilizadas como ferramentas auxiliares nos programas de melhoramento, principalmente devido aos marcadores moleculares permitirem acessar todo o genoma do organismo e, o que é mais importante, não serem influenciados pelo ambiente. Na identificação de variabilidade genética para programas de melhoramento vegetal, várias metodologias podem ser citadas. Dentre estas, a Análise Multivariada vem sendo amplamente utilizada, pois fornece a vantagem da avaliação simultânea de diversos caracteres para o dimensionamento da dissimilaridade, mostrando-se efetiva em várias espécies como sorgo (OLIVEIRA *et al.*, 1996), arroz (MORAIS *et al.*, 1999), entre outras.

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi estimar a dissimilaridade genética entre famílias mutantes de arroz e o genótipo que deu origem a elas através do emprego de marcadores AFLP.

A técnica de marcadores moleculares AFLP (VOS *et al.*, 1995) foi escolhida para a análise dos genótipos mutantes por ser uma técnica com elevado índice de *multiplex* (aproximadamente 40 locos amplificados resultado que depende também da espécie utilizada).

Dez sementes das 35 famílias mutantes junto as sementes do genótipo BRS 7 "TAIM" semeadas em baldes e mantidas em estufa com temperatura e umidade controlada para favorecer seu crescimento até obter folhas jovens suficientes para realizar a extração do material genético. O DNA das plantas de cada família foi extraído utilizando o método CTAB descrito por SAGHAI-MAROOF *et al.* (1984). O produto da extração foi quantificado em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo na concentração final de 5 µg mL<sup>-1</sup> para ser visualizado com luz UV (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A técnica AFLP foi aplicada sobre as 35 famílias e ao genótipo BRS 7 "TAIM" de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (*Life technologies – GIBCO*<sup>®</sup>).

Ao produto de amplificação foi adicionado 2/3 do seu volume de tampão de carga (98% formamida, 10 mM EDTA pH 8,0, azul de bromofenol e xileno cianol), seguido de desnaturação a 94°C durante 6 minutos e aplicação no gel de acrilamida 6% em condições desnaturantes. A corrida eletroforética foi realizada em cuba de sequenciamento manual modelo HOEFER *SQ3 Sequencer* durante aproximadamente 2h com potência constante de 60 watts. A revelação dos fragmentos amplificados foi realizada de acordo com o protocolo de coloração com nitrato de prata (Briard *et al.*, 2000).

Os dados de presença/ausência de bandas obtidos na análise de AFLP das 35 famílias e as duas testemunhas analisadas permitiram o cálculo da dissimilaridade genética entre todos os pares de genótipos, com o auxílio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000) utilizando o coeficiente de DICE (1945). Com base na matriz de dissimilaridade gerada foi construído um dendograma pelo método de agrupamento

UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*). Para a verificação do ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma obtido foi calculado o coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ), segundo SOKAL e ROHLF (1962).

Através da análise de AFLP, utilizando as 9 combinações de *primers*, foram obtidos um total de 206 marcadores, dos quais 184 (89.32%) foram polimórficas e 22 (10.68%) foram monomórficas. Nessa ordem, as combinações C3, C7 e C6 revelaram um maior número de marcadores polimórficos com 30, 26 e 25, respectivamente. A combinação C9 foi a que revelou o menor número de marcadores polimórficos com somente 10 (Tabela 1). O elevado número de marcadores polimórficos observados revela o grande potencial da técnica AFLP em detectar variabilidade genética presente na coleção de genótipos em estudo e o grande efeito da mutação em aumentar a variabilidade.

O valor da matriz cofenética ( $r$ ) obtido da comparação das matrizes de similaridade e do dendrograma foi de 0,65. Esse valor considera-se representativo e, reflete a precisão do dendrograma na representação gráfica dos dados da matriz de dissimilaridade entre as famílias. O valor do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 42, indicando assim que um 58% da variação é aleatória.

Baseado no valor médio das distâncias genéticas (0,74) pode-se visualizar a formação de oito grupos, dois principais, dois menores e quatro formados por uma única família. O grupo maior inclui 24 famílias (1, 2, 17, 19, 21, 10, 15, 16, 27, 24, 25, 26, 3, 6, 14, 5, 7, 11, 23, 22, 29, 28, 31 e, 34) o que representa o 64,86% (Grupo I – Figura 1). Num segundo grupo, ficaram as famílias 4, 9, 12, 18 e, 20 que apresentaram maior similaridade genética entre elas, (Grupo II – Figura 1). Os demais blocos não apresentaram agrupamento distintivo. Quatro grupos estão representados por uma única família (IV, V, VI e, VIII) evidenciando assim, a grande dissimilaridade apresentada por estas em relação às demais famílias utilizadas na análise. A cultivar BRS7-TAIM (37) que deu origem às famílias mutantes, ficou isolada no grupo VI evidenciando assim a forte influencia da mutação na criação de variabilidade.

Baseado nos valores da distância genética calculadas pelo método DICE, as famílias mais similares foram as 19 e 21 com uma distância de 0,448 e as mais dissimilares foram a 33 com a 9 apresentando uma distância de 0,953 (Figura 1).

PALAVRAS CHAVES: mutação, variabilidade genética, tolerância ao estresse.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BRIARD, M., CLERA, V.LE, GNZEBELUS, D., SENALIK, D AND SIMON, P.W. Modified Protocols for rapid carrot genomic ADN extraction and AFLP™ analysis using silver stain on radioisotopes. **Plant Molecular Biology Reporter** v.18, p.235 – 241, 2000.
- DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, Washington, v.26, n.3, p.297-307, 1945.
- GALE, M.D.; DEVOS, K.M. Comparative genetics in the grass. **Proc. Natl. acad. Sci**, v.95, p.1971-1974, 1998.
- MORAIS, O.P.; SILVA, J.C.; CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; NEVES, P.C.F. Divergência genética entre os genótipos da população de arroz irrigado CNA-IRAT 4. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.217-224, 1999.
- OLIVEIRA, A.C.; RICHTER, T.; BENNETZEN, J.L. Regional and racial specificities in sorghum germoplasm assessed with DNA markers. **Genome**, Canadá, v.39, p.579-587, 1996.
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome

location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.

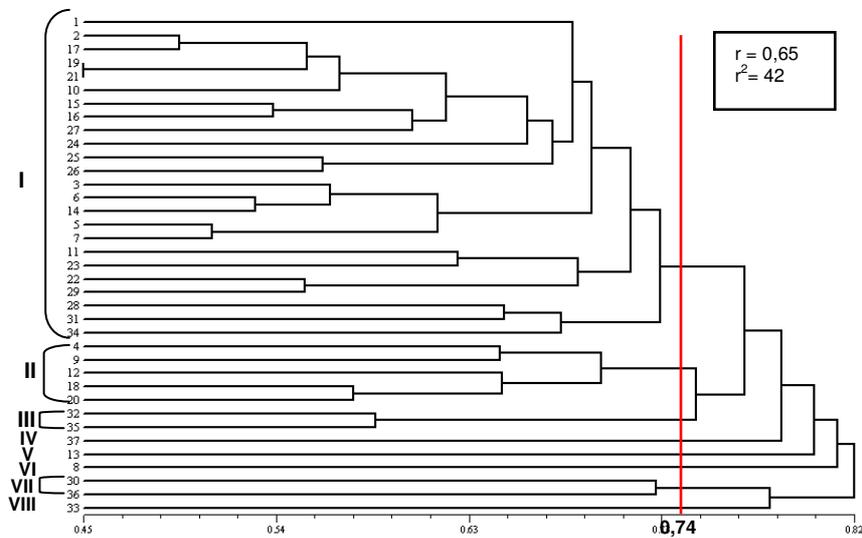
SAMBROOK; MANIATIS & FRITSCH. *A laboratory Manual*. Second edition, 1989.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

VOS, P.; HOGRES, R.; BLEEKER, M; REIJANS, M; LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for ADN fingerprinting. *Nucleic Acid Reserch*, v.23(21), p.4407-4414, 1995.

Tabela 1. Relação das 9 Combinações de *primers* utilizadas na análise de AFLP e número de bandas polimórficas obtidas.

Combinação de <i>primers</i>	Nº de bandas Polimórficas
M-CAA; E-AGG	18
M-CTA; E-ACA	22
M-CAC; E-AAC	30
M-CAG; E-ACC	15
M-CAT; E-AGC	24
M-CTG; E-ACT	25
M-CAA; E-AAC	26
M-CAA; E-AGC	16
M-CTG E-AGG	10
<b>TOTAL</b>	<b>184</b>



**Figura 1.** Dendrograma das 35 famílias mutantes mais o genótipo BRS 7 "TAIM" obtido a partir da análise de AFLP utilizando o índice de similaridade de Dice (1945) e o método de agrupamento UPGMA. O ponto de corte foi de 0,74. CGF/FAEM/UFPEL, Pelotas, 2007.