

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO FENÓTIPO ESPIGUETAS AGRUPADAS EM ARROZ (*Oryza sativa* L.).

Juliana Vieira Raimondi¹, Rubens Marschalek², Ester Wicker³, Adriana Pereira⁴, Rubens Onofre Nodari⁵.

Palavras-chave: Produtividade, mutação natural, SSR

INTRODUÇÃO

A característica espiguetas agrupadas em arroz (*Oryza sativa* L.) foi inédita e originalmente relatada no Brasil em 1997 pelo Dr. Satoru Yokoyama (In Memoriam) pesquisador da Epagri. Esta característica é oriunda de mutação natural e ocorreu em um único perfilho de uma planta do acesso “Amaghad” (YOKOYAMA et al., 1999). As plantas com esta característica possuem a estrutura da inflorescência alterada, apresentando 2 a 5 espiguetas agrupadas em cada nó do ráquis, enquanto plantas normais tem somente uma espiguetas.

Sementes deste perfilho foram colhidas e multiplicadas na safra seguinte, o que resultou em uma população de aproximadamente 100 plantas completamente estabilizadas geneticamente com panículas cujas espiguetas foram bastante agrupadas. Este acesso foi nomeado de Multiespigueta, o qual foi mantido no banco de germoplasma da Epagri e utilizado desde então como genitor em hibridação controlada. É um acesso de tipo tradicional, com alto perfilhamento, estatura elevada, panículas pequenas, grãos curtos e de pericarpo vermelho.

Descendentes do cruzamento de Multiespigueta com cultivares normais (com panículas do tipo simples), podem apresentar cinco graus de agrupamento das espiguetas, que são caracterizados de acordo com os seguintes descritores: 1. Toda panícula com 3 a 5 grãos agrupados, 2. Panículas com 3 grãos agrupados seguidos de 3 simples, 3. Panículas com 3 grãos agrupados seguidos de 4 simples, 4. Panículas com apenas 2 grãos agrupados no ápice da panícula e, 5. Panículas simples (sem agrupamentos).

Em 2006, esta característica também foi observada no município de Formoso do Araguaia, Tocantins, pela Embrapa-CNPAP, cuja linhagem foi nomeada de CNA 10928 (DURÃO, 2008). Este acesso possui as espiguetas agrupadas no mesmo nó do ráquis à semelhança do genótipo descoberto pela Epagri, no entanto, morfológicamente, caracteriza-se por ser uma planta de tipo moderno.

Segundo Durão (2008), a característica encontra-se em uma região flanqueada pelos microssatélites RM6446 e RM20330 no cromossomo 6. Com base nesta informação, o objetivo do presente trabalho foi verificar se os marcadores Microssatélites (SSR) supracitados são eficientes para caracterizar o fenótipo espiguetas agrupadas da Epagri.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Epagri na Estação Experimental de Itajaí- EEI. Foram utilizadas 12 linhas endogamicas recombinantes (LERs) em geração F7 e quatro testemunhas, as quais foram analisadas na forma de Bulk Segregant Analysis – BSA (Tabela 1) . Os marcadores Microssatélites – SSR utilizados foram RM 6446 e RM 20330. Todas as LERs são descendentes do cruzamento entre a linhagem SC 339 de panículas simples com Multiespigueta de panículas tipo 1. Cada bulk

¹ Biol., M.Sc. Doutoranda em Recursos Genéticos Vegetais/UFSC - Rodovia Admar Gonzaga, 1346 Bairro Itacorubi, 88.034-001 - Florianópolis - SC, E-mail: jojuvieira@terra.com.br.

² Eng. Agr. Dr., Epagri-EEI

³ Enga. Agra. Dra. Epagri-EEI

⁴ Quím. M.Sc. Epagri-EEI

⁵ Eng. Agr. Dr. UFSC-RGV

foi formado de 10 plantas selecionadas ao acaso de uma parcela composta de 65 plantas, todas estabilizadas geneticamente para cada fenótipo da panícula (1 a 5).

Tabela 1. Bulks e seus respectivos fenótipos de linhas endogâmicas recombinantes de arroz oriundas do cruzamento SC 339 com Multiespigueta, utilizados para caracterização molecular.

Bulk	Fenótipo
01	1 = toda panícula com 3 a 5 grãos agrupados
02	1 = toda panícula com 3 a 5 grãos agrupados
03	1 = toda panícula com 3 a 5 grãos agrupados
04	2 = 3 grãos agrupados seguidos de 3 simples
05	2 = 3 grãos agrupados seguidos de 3 simples
06	2 = 3 grãos agrupados seguidos de 3 simples
08	3 = 3 grãos agrupados seguidos de 4 simples
09	3 = 3 grãos agrupados seguidos de 4 simples
11	4 = apenas 2 grãos agrupados no ápice da panícula
12	4 = apenas 2 grãos agrupados no ápice da panícula
13	5 = Simples = sem agrupamentos
15	5 = Simples = sem agrupamentos
Testemunhas	
17-SC 339	5 = Simples = sem agrupamentos
18-SCSBR5 TioTaka	5 = Simples = sem agrupamentos
19-Multiespigueta	1 = toda panícula com 3 a 5 grãos agrupados
20-CNA 10928	1 = toda panícula com 3 a 5 grãos agrupados

A coleta das amostras foliares para extração de DNA foi realizada logo após o florescimento a fim de confirmar o fenótipo de cada planta. A extração de DNA foi de acordo com DOYLE & DOYLE (1990).

As reações de amplificação pela técnica SSR foram realizadas seguindo o protocolo: tampão 1 x (Tris-HCl 10 mM/L + KCl 50 mM/L, pH 8,4), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,25 mM/cada, iniciador SSR 0,4 uM, Taq DNA polimerase 1 U, DNA 20 ng, em volume final de 25 uL. Os iniciadores SSR utilizados foram RM 6446 e RM 20330, ambos com temperatura de anelamento de 55°C. as condições de termociclagem foram: 2 minutos de desnaturação inicial (96°C), seguido de 30 ciclos de desnaturação (94°C), anelamento (55°C) e extensão (72°C) de 30 segundos cada, e 30 min de extensão final (72°C). Os produtos resultantes da amplificação SSR foram estudados com auxílio do analisador genético ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados com o software GeneMapper 4.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O marcador RM 6446 não foi polimórfico para a característica espiguetas agrupadas. Já o marcador RM 20330 apresentou dois alelos associados a característica, sendo, plantas com panículas sem agrupamento (simples) mostraram ser portadoras do alelo 265 pb (Figura 1B) e plantas com as espiguetas agrupadas, independente do grau de agrupamento, apresentaram o alelo 260 pb (Figura 1 A). O resultado foi confirmado com a análise individual das plantas componentes dos bulks. Somente o bulk 06, que apresenta o fenótipo de panículas tipo 2, teve uma planta entre as dez que apresentou os dois alelos. Assim, três possibilidades podem ser consideradas: pode ter havido alguma mistura, o *locus* ainda segregava nesta planta, ou, se deve ao fato de que *loci* microsatélites estão localizados em regiões hipervariáveis do genoma sendo mais sensíveis a mutações (CAIXETA et al, 2006).

O marcador RM 20330 está localizado a 198 cM do gene, no cromossomo 6 (DURÃO, 2008). Existem três mapas que referenciam a característica espiguetas agrupadas

(GRAMENE, 2013), e em todos, os marcadores associados a característica estão localizados no cromossomo 6 entre 90 e 110 cM.

É importante ressaltar que se faz necessário um rastreamento mais intenso ao longo do cromossomo 6 com marcadores SSR, a fim de aproximar-se mais estreitamente do gene possibilitando seu mapeamento.

Além do Brasil, a característica também foi evidenciada na China (ZHENG et al., 2003) onde os autores realizaram estudos moleculares e também encontraram no cromossomo 6 marcadores associados positivamente a característica espiguetas agrupadas.

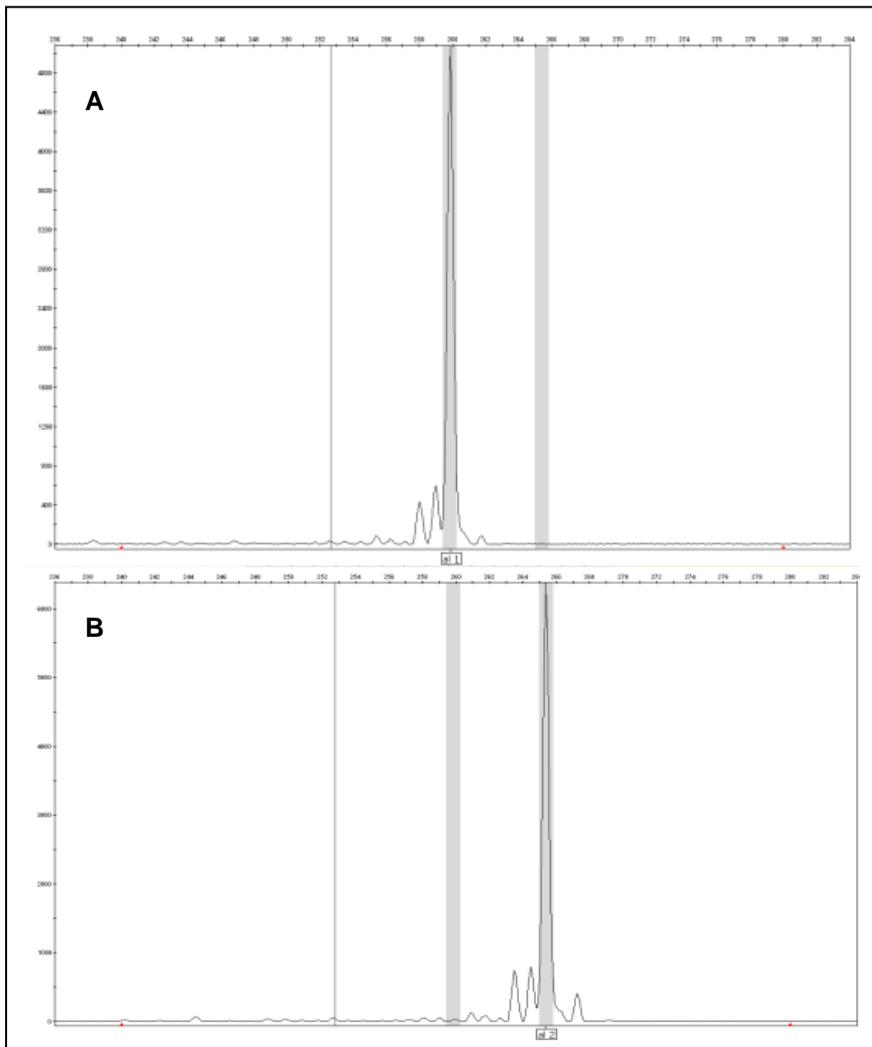


Figura 1. Análise com marcador microsatélite RM 20330 no cromossomo 6 em arroz, caracterizando LERs que apresentam a característica espiguetas agrupadas com o alelo de

260 pb (A) e LERs simples (que não possuem as espiguetas agrupadas) com o alelo de 265 pb.

CONCLUSÕES

O marcador RM 20330 foi eficiente para caracterizar o fenótipo espiguetas agrupadas da Epagri e também da Embrapa. Já o marcador RM 6446 não é polimórfico para a característica em questão.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro de CNPq (Projeto 402214/2008-0) e da FAPESC (6980/10-9).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B. de; BRITO, G.G. de; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006, p. 9-78.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **BRL Focus** vol.12, n.1, p. 13-15, 1990.

DURÃO, R. da S. **Mapeamento genético de região genômica associada ao controle de arquitetura de panícula de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília,DF.

GRAMENE. 2013. Disponível em: www.gramene.org. Acesso em: 10 abril 2013.

YOKOYAMA, S.; BACHA, R.E.; ISHIY, T. Multi-espiguetas, genótipo em potencial para uso em melhoramento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO 1 e REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 23., 1999, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999, p. 111.

ZHENG, L.; ZHU, X.; QIAN, Q.; ZHAO, Z.; ZHANG, J.; HU, X.; LIN, H.; LUO, D. Morphology and mapping analysis of rice (*Oryza sativa*) clustered spikelets (Cl) mutant. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n.6, p. 559-562, 2003.