

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ACESSOS DE ARROZ VERMELHO COLETADOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL¹

Gaspar Malone², Paulo Dejalma Zimmer², Maria Alice da Silva de Castro²,
Letícia Noemi Arias³, Geri Eduardo Meneghello², Silmar Teichert Peske²

ABSTRACT

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RED RICE ECOTYPES FROM RIO GRANDE DO SUL STATE, BRAZIL

Red rice is one of the most important weeds of cultivated rice in Brazil. On the other hand, red rice constitutes a collection of genes lost during the cultivated rice domestication process and has a fundamental importance for recovery of promising genic constitutions. This study had the objective to analyze the genetic variability of a collection of red rice (*Oryza sativa* L.) ecotypes from Rio Grande do Sul State, Brazil, through isoenzymatic and microsatellite markers. Thirty four accesses from the Seed and Biotechnology Laboratory germplasm bank, at Federal University of Pelotas, were analyzed using six isoenzymatic systems and nineteen microsatellite markers. Twenty-three biochemical and 54 molecular alleles were identified and used to estimate the polymorphism (PIC) and genetic similarity indexes. The analyzed red rice population presents large genetic variability, evidencing the potentiality to map characteristics of interest to seed physiology. Biochemical markers of the isoenzyme type and molecular markers of the microsatellite type are efficient to estimate the genetic variability in red rice ecotypes.

KEY WORDS: *Oryza sativa*, biochemical markers, microsatellite markers, genetic variability.

INTRODUÇÃO

O arroz é uma das espécies melhor representadas em coleções de germoplasma *ex-situ* no mundo (Jackson & Juggan 1993). O surgimento das tecnologias de marcadores bioquímicos, na década de 1960, e de DNA, na década de 1980, auxiliaram decisivamente na caracterização e manutenção

RESUMO

O arroz vermelho é uma das principais espécies daninhas para cultivo de arroz no Brasil. Por outro lado, constitui-se num acervo de genes perdidos durante a domesticação do arroz cultivado, que poderá ser importante para a recuperação de constituições gênicas promissoras. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de uma coleção de acessos de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) coletados no Estado de Rio Grande do Sul, Brasil, através de marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas, e marcadores moleculares do tipo microssatélites. Trinta e quatro acessos, pertencentes ao banco de germoplasma do Laboratório de Sementes e Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas, foram analisados utilizando seis sistemas isoenzimáticos e dezenove marcadores microssatélites. Vinte e três alelos bioquímicos e 54 moleculares foram identificados e utilizados para estimar os índices de polimorfismo (PIC) e de similaridade genética. Os resultados indicam que a população de arroz vermelho analisada apresenta grande variabilidade genética, evidenciando potencialidade para o mapeamento de características de interesse à fisiologia de sementes. Marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas e marcadores moleculares do tipo microssatélite são eficientes para estimar a variabilidade genética em acessos de arroz vermelho.

PALAVRAS-CHAVE: *Oryza sativa*, marcadores bioquímicos, microssatélites, variabilidade genética.

desses recursos genéticos de tão elevado valor estratégico (Olufowote *et al.* 1997, Virk *et al.* 1995) e, também, na determinação da estrutura genética e dos padrões de variabilidade entre cultivares (Akagi *et al.* 1997, Mackill 1995, Yang *et al.* 1994).

Os marcadores bioquímicos, do tipo isoenzimas, apresentam algumas desvantagens com relação às demais técnicas de caracterização molecular utilizadas

1. Trabalho recebido em nov./2005 e aceito para publicação em maio/2007 (registro nº 673).

2. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Depto. de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Univ. Fed. de Pelotas. Campus Universitário s/n. CEP 96010-100. Cx.Postal 354. Email: gmalone@ufpel.edu.br; geriem@ufpel.edu.br

3. Universidad de Morón, Cabildo 134, (B1708JPD) Morón, Buenos Aires, Argentina

atualmente. As isoenzimas são produtos da expressão gênica e, conseqüentemente, são muito influenciadas pelo ambiente. As técnicas isoenzimáticas são altamente influenciadas pelo estágio de desenvolvimento, pois os genes que controlam a sua expressão manifestam-se em determinadas fases do desenvolvimento e em órgãos e tecidos específicos (Ramirez *et al.* 1991). Isso, sem dúvida, constitui-se numa desvantagem desses marcadores em relação às demais técnicas de marcação molecular.

Ao contrário dos descritores morfológicos, os marcadores moleculares de DNA podem revelar diferenças entre os genótipos mais eficientemente, por caracterizarem diretamente o genoma do organismo, não sendo influenciados pelo ambiente (Malone & Zimmer 2005). Entre os vários tipos de marcadores moleculares que estão disponíveis, merecem destaque RFLP – *restriction fragment length polymorphism* (Botstein *et al.* 1980), RAPD – *random amplified polymorphic DNA* (Williams *et al.* 1990), AFLP – *amplified fragments length polymorphism* (Vos *et al.* 1995) e Microsatélites ou SSR – *simple sequence repeats* (Tautz 1989).

Os microsatélites são marcadores baseados na amplificação de DNA pela "reação em cadeia da polimerase" (PCR – *polimerase chain reaction*) e têm sido muito utilizados pelos geneticistas de plantas, especialmente porque apresentam uma relação custo/benefício baixa e, dependendo da espécie, um grande número de microsatélites pode ser obtido. No arroz, centenas de locos SSR têm sido disponibilizados publicamente (Panaud *et al.* 1995, Chen *et al.* 1997, Temnykh *et al.* 2000). Comparado com as demais técnicas de marcadores moleculares, os marcadores do tipo microsatélite são altamente polimórficos em espécies ou indivíduos de uma mesma população. Vários trabalhos manifestam a sua utilidade e aplicabilidade em arroz (Akagi *et al.* 1997, Wu & Tanksley 1993, Yang *et al.* 1994).

Os marcadores do tipo microsatélite, assim como os marcadores do tipo isoenzimático, apresentam uma vantagem em comum. Ambos são marcadores de tipo co-dominante, o que possibilita a identificação de todos os alelos (variantes) para um mesmo gene/loco. Isso é de fundamental importância em estudos de estruturação genética de populações, análises de paternidade e contaminações genéticas, por exemplo.

Vários estudos sobre diversidade genética em arroz vermelho têm sido reportados. Como

exemplo, coleções de arroz vermelho têm sido classificadas nas subespécies *indica* e *japonica*, com base em características morfológicas e fisiológicas, isoenzimas e marcadores moleculares do tipo RFLP e RAPD (Cho *et al.* 1995, Suh *et al.* 1997). Langevin *et al.* (1990) analisaram a similaridade genética entre o arroz vermelho e variedades comerciais utilizando os sistemas isoenzimáticos catalase (CAT), isocitrato desidrogenase (IDH) e fosfoglucoisomerase (PGI). Trabalhos semelhantes, desenvolvidos por Augustin *et al.* (1997), diferenciaram o arroz vermelho das variedades de arroz comercial, utilizando as enzimas fosfoglucoisomerase (PGI) e esterase (EST).

Marcadores do tipo microsatélite também têm sido utilizados na caracterização de populações de arroz daninho e na identificação de hibridizações entre as cultivares convencionais e os diferentes tipos de arroz infestante (Gealy *et al.* 2002).

O conhecimento das relações genéticas entre acessos de arroz vermelho poderá ser considerado para a escolha de genitores em estudos de hibridizações com variedades de arroz cultivado para a geração de populações de mapeamento. Com isso, pode-se buscar o desenvolvimento de marcadores ou a clonagem de genes relacionados a caracteres de interesse à fisiologia de sementes, tais como germinação a grandes profundidades, vigor, tolerância ao frio e ciclo (Redona & Mackill, 1996). Trabalhos semelhantes, utilizando variedades silvestres no desenvolvimento de populações de mapeamento para características de interesse ao melhoramento do arroz, são reportados na literatura (Rangel *et al.* 2005, Borba *et al.* 2006, Brondani *et al.* 2004).

O presente trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade genética em uma coleção de acessos de arroz vermelho, através da utilização de marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas e marcadores moleculares do tipo microsatélite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 34 acessos de arroz vermelho, pertencentes ao banco de gemoplasma do Laboratório de Sementes e Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). O acessos foram coletados no campo, em lotes de produção. Sementes de cada acesso foram germinadas e acondicionadas em rolo de papel a 25°C de temperatura, segundo a indicação de Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil 1992). Após quinze dias, material foliar proveniente

das plântulas foi coletado em *bulk* para cada acesso e mantido a -20°C, até o momento da extração de DNA. Para extração de isoenzimas, foram utilizadas dez sementes secas de cada acesso.

Para a análise molecular utilizando micros-satélites, um *bulk* de dez plantas, para cada um dos 34 acessos, foi utilizado para a extração de DNA conforme protocolo CTAB 2% (Saghai Maroof *et al.* 1984). Empregaram-se dezenove pares de *primers* (Tabela 1), previamente utilizados por Panaud *et al.* (1995), para análises de mapeamento genético em arroz.

As reações de amplificação (PCR) foram realizadas em termociclador PTC-100, segundo protocolo descrito por Junjian *et al.* (2002). Combinaram-se 50 ng de DNA genômico total com 330 nM de cada *primer* microssatélite, 250 µM de cada dNTP (mistura de desoxinucleótidos) e 0,6 U de Taq DNA polimerase, em volume final da reação de 15 µL. O seguinte programa de amplificação foi utilizado: *i*) desnaturação inicial a 94°C por 3 min.; *ii*) 35 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 2 min., 72°C por 1,5 min.; e *iii*) extensão final a 72°C por 5 min. O produto da amplificação foi visualizado mediante eletroforese horizontal.

Para a análise bioquímica utilizando isoenzimas, um *bulk* de dez sementes para cada acesso foi macerado em gral de porcelana sobre cubos de gelo. De cada amostra, 200 mg do extrato vegetal foram colocados em tubo *ependorf*, acrescidos de solução extratora (tampão do gel + 0,15% de 2-mercapto-etanol) na proporção 1:3 (p/v). Foram utilizados os sistemas isoenzimáticos esterase (EST), fosfatase ácida (ACP), glutamato desidrogenase (GTDH),

glutamato oxalacetato transaminase (GOT), malato desidrogenase (MDH) e álcool desidrogenase (ADH). A eletroforese das isoenzimas foi realizada em géis de poliácridamida 7%, com 20 µL de cada amostra. Os géis foram colocados em cubas eletroforéticas mantidas em câmara fria sob temperatura entre 4°C e 6°C. As migrações eletroforéticas foram realizadas com uma diferença de potencial de 10 V cm⁻¹, até que a frente de corrida, formada pelo azul de bromofenol, atingisse 9,0 cm do ponto de aplicação. Foram utilizados os sistemas de coloração descritos por Scandalios (1969) e Alfenas (1998).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC – *polymorphism information content*), proposto por Anderson *et al.* (1993), foi calculado em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência na população estudada. Isso, para se determinar os valores de cada marcador na detecção de polimorfismo entre os 34 acessos de arroz vermelho analisados. Os valores de PIC para cada marcador foram determinados pela fórmula:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Nesta expressão, P_{ij} é a frequência do alelo "j" no marcador "i" (a soma se estende por todos os alelos). O cálculo foi baseado no número de alelos detectados por marcador para um determinado loco e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos 34 acessos analisados. O valor do PIC varia de "0", para perfis monomórficos, até "1", para perfis altamente poli-mórficos. Entretanto, se houver mais de dois alelos por loco e estes encontrarem-se em heterozigose, o valor de PIC supera a unidade (1,0). Assim, esse valor está relacionado com o número de alelos, que, por sua vez, está diretamente associado à divergência genética e ao número de genótipos em estudo.

A presença (1) ou ausência (0) de cada alelo microssatélite e isoenzimático foi determinada e utilizada para a construção de uma matriz binária de dados. As análises de similaridade genética de correção cofenética e de agrupamento foram realizadas utilizando-se o software NTSyS pc 2.1 (Rohlf 2000). A similaridade genética foi estimada usando-se o coeficiente de Nei & Li (1979). A similaridade genética média e a análise de *bootstrapping* com 1.000 amostragens, foram utilizadas como critério para o estabelecimento dos grupos. Os 34 acessos foram agrupados com base na matriz de similaridade genética

Tabela 1. Sequência de reassociação e localização cromossômica dos dezenove *primers* microssatélite, utilizados na caracterização de acessos de arroz vermelho (Pelotas-RS, 2005).

Primer ¹	Cromossomo	Sequência de reassociação (5'-3')	
		Direta	Inversa
RM55	3	CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG	TCCCGGTTATTTAAGGCG
RM81	1	GAGTGCCTGTGCAAGATCCA	CTTCTCACTCATGCAAGTTC
RM202	11	CAGATTGGAGATGAAGTCCTCC	CCAGCAAGCATGTCAATGTA
RM205	9	CTGGTTCTGTATGGGAGCAG	CTGGCCCTTCACGTTTCAAGT
RM207	2	CCATTCTGTGAGAAGATCTGA	CACCTCATCCTCGTAACGCC
RM210	8	TCACATTGGTGGCATTG	CGAGGATGGTTGTTCACTTG
RM212	1	CCACTTTCAGCTACTACCAG	CACCCATTGTCTCTCATTATG
RM219	9	CGTCCGATGATGTAAGCCT	CATATCGGCATTCGCGCT
RM220	1	GGAAGGTAACGTGTTCCAAC	GAAATGCTTCCACATGTCT
RM222	10	CTTAAATGGGCCACATGCG	CAAAGCTTCCGGCCAAAAG
RM223	8	GAGTGAAGCTTGGGCTGAAAC	GAGGCAAGCTTTGGCACTG
RM232	3	CCGGTATCCTTCGATATTGC	CCGACTTTCTCTCTGACG
RM233	2	CAAATGAACCTACATGTTG	GCATTGCAGACAGCTATTGA
RM234	7	ACAGTATCCAAGGCCCTGG	CACGTGAGACAAAGACGGGAC
RM239	10	TACAAAATGCTGGGTACCCC	ACATATGGGACCCACCTGTG
RM241	4	GAGCCAAATAAGATCGCTGA	TGCAAGCAGCAGATTTAGTG
RM247	12	TAGTGCAGATCGATGTAACG	CATATGGTTTTGACAAAAGCG
RM249	5	GGCGTAAAGGTTTTGATGTC	ATGATGCCATGAAGGTCAGC
RM261	4	CTACTTCTCCCTTGTGTCG	TGTACCATCGCCAAATCTCC

¹ - RM - rice microsatellite

utilizando-se o método de ligação completa (Rohlf 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de microssatélites

Os dezenove marcadores analisados detectaram 54 locos nos acessos de arroz vermelho estudados, dos quais 52 (94,54%) foram polimórficos. O número de alelos por loco variou de um (RM239 e RM222) até cinco (RM233), com uma média de 2,89 alelos por loco. Embora fosse esperada alta variabilidade genética, em função de serem acessos silvestres, esse valor é considerado elevado para uma espécie diplóide (Brondani *et al.* 2004).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0 (zero) até 0,97, com uma média de 0,53 (Tabela 2). Esse valor é similar ao estimado por Ni *et al.* (2002), que, analisando cultivares de arroz das subespécies *indica* e *japonica*, detectaram um valor médio de PIC de 0,62. Dos dezenove marcadores SSR, dezessete amplificaram mais de uma banda por genótipo. Isso pode estar relacionado com o elevado grau de heterozigose, que ocorre pelo fato de os acessos não se constituírem em linhagens puras, o que revela também a grande variabilidade genética dentro dos acessos. Pelo contrário, descendem de populações naturais que sofrem fluxo gênico com cultivares comerciais. Nesse aspecto, destacam-se os locos RM202, RM212 e RM 223, os quais apresentaram apenas um alelo no acesso 45. Da mesma forma, o loco RM205 apresentou um alelo somente nos acessos 3 e 45. Seguindo este raciocínio, o loco RM207 foi o único em apresentar um alelo no acesso 26, e o loco RM220, o único em apresentar um alelo no acesso 31.

A similaridade genética, estimada com base no coeficiente de Nei & Li (1979), variou de 0,50 até 1,00, com distância genética média de 0,81. A análise de agrupamento mediante o método de ligação completa, utilizando a distância genética média como ponto de corte para a formação dos grupos, permitiu definir dez agrupamentos de acessos, com destaque aos acessos 7, 38 e 45 que permaneceram formando grupos únicos, com apenas um genótipo (Figura 1).

Por outro lado, os valores de *bootstrapping* permitiram visualizar alguns agrupamentos diferentes dos obtidos com base na similaridade genética média. Como exemplo, o agrupamento mais consistente, com valor de *bootstrapping* de 83,7, foi aquele entre o

Tabela 2. Frequência e valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), para cada um dos 54 alelos microssatélite analisados na caracterização de acessos de arroz vermelho (Pelotas-RS, 2005).

Loco microssatélite ¹	Cromossomo	Alelo	Frequência ²	PIC
RM55	3	1	0,0588	0,9412
		2	0,2941	0,7059
		3	0,8529	0,1471
RM81	1	1	0,0294	0,9706
		2	0,2059	0,7941
RM202	11	1	0,9412	0,0588
		2	0,0294	0,9706
		3	0,1471	0,8529
RM205	9	1	0,4412	0,5588
		2	0,8529	0,1471
		3	0,0294	0,9706
		4	0,9118	0,0882
RM207	2	1	0,9412	0,0588
		2	0,1176	0,8824
		3	0,0588	0,9412
RM210	8	1	0,7647	0,2353
		2	0,0588	0,9412
		3	0,7059	0,2941
RM212	1	1	0,5294	0,4706
		2	0,0294	0,9706
		3	0,8824	0,1176
RM219	9	1	0,0294	0,9706
		2	0,9118	0,0882
		3	1,0000	0,0000
RM220	1	1	0,0294	0,9706
		2	0,9706	0,0294
		3	0,1176	0,8824
		4	0,8235	0,1764
RM222	10	1	0,9706	0,0294
		1	0,0294	0,9706
RM223	8	2	0,0294	0,9706
		3	0,0294	0,9706
		4	0,9412	0,0588
		1	0,6176	0,3824
RM232	3	2	0,6765	0,3235
		3	0,7941	0,2059
		4	0,0882	0,9118
RM233	2	1	0,9706	0,0294
		2	0,0294	0,9706
		3	0,1176	0,0000
RM234	7	1	0,0294	0,8824
		2	0,9412	0,0588
		3	0,9706	0,0588
RM239	10	1	0,029	0,9706
		1	0,1471	0,8529
RM241	4	2	0,8529	0,1471
		3	0,0294	0,9706
		1	0,9706	0,0294
RM247	12	2	0,0294	0,9706
		1	0,8824	0,1176
RM249	5	2	0,2059	0,7941
		3	0,0294	0,9706
		1	0,9412	0,0588
RM261	4	2	1,0000	0,0000
		1	0,9706	0,0294

¹- RM: rice microsatélite; ²- Frequência de cada alelo na população estudada (se houver mais de dois alelos por loco e estes encontrarem-se em heterozigose, a soma destes valores por loco supera a unidade).

acesso 45 e o restante dos acessos. Os demais agrupamentos consistentes com base na análise de *bootstrapping* foram, na maioria dos casos, confirmados por apenas dois acessos, sendo que os valores mais baixos foram obtidos para os agrupamentos estabelecidos pela similaridade genética média (Figura 1).

Dos 55 alelos identificados pela técnica de microssatélites, 26 apresentaram frequências

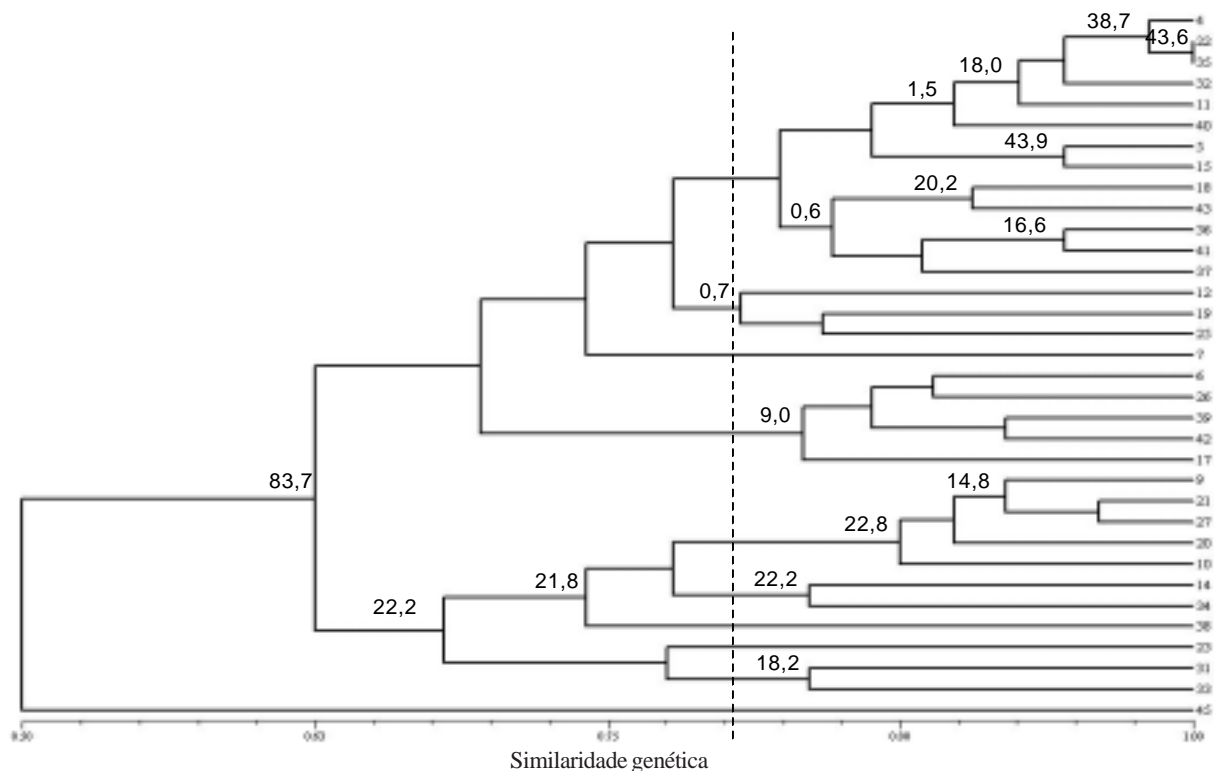


Figura 1. Dendrograma obtido com base na similaridade genético-molecular de acessos de arroz vermelho, utilizando-se 55 marcadores microssatélites (o agrupamento foi obtido pelo método da ligação completa; os valores de *bootstrap* estão ao lado dos nós; e a linha pontilhada vertical indica a similaridade genética média, isto é, o ponto de corte do dendrograma para a formação dos grupos).

inferiores a 25%, sendo um indicativo de variabilidade alélica entre os acessos estudados. Além disso, os nove alelos únicos para apenas um genótipo contribuíram de maneira significativa para a separação dos genótipos nos diferentes grupos. A ocorrência de vários alelos únicos pode ser um indicativo da alta taxa de mutação nos locos SSR e de recombinações desiguais, o que pode gerar novos alelos (Henderson & Petes 1992).

Análise isoenzimática

Os seis sistemas enzimáticos analisados detectaram 23 alelos isoenzimáticos, dos quais 21 foram polimórficos (91,30%). O número de alelos detectados variou de cinco para o sistema malato desidrogenase (MDH) até dois para álcool desidrogenase (ADH). Para esterase (EST), os resultados obtidos concordam com Wu *et al.* (2005), que, analisando isoenzimas de esterase em 848 acessos de arroz, concluíram ter a maioria deles entre duas e quatro bandas eletroforéticas. Este sistema enzimático tem sido o mais estudado em arroz (Endo

& Morishima 1983). Para o sistema malato desidrogenase (MDH), o número de alelos identificados foi superior ao pesquisado por Lizhi *et al.* (2002), que, analisando 149 acessos de arroz selvagem, identificaram três alelos. O número de alelos encontrados para fosfatase ácida (ACP) foi inferior ao encontrado por Guidolin (1993) e Bonow *et al.* (2001) os quais estudando os padrões isoenzimáticos em plântulas de arroz de oito dias identificaram sete alelos para fosfatase ácida. Provavelmente isso se explica por eles terem analisado acessos de arroz preto e variedades comerciais, o que acrescenta maior variabilidade genética ao estudo. O conteúdo alélico do sistema glutamato desidrogenase foi superior ao pesquisado por Lizhi *et al.* (2002), que identificaram apenas um alelo em arroz por este sistema. Por outro lado, Kanamori *et al.* (1972) identificaram maior intensidade de expressão de GDH em plântulas de duas semanas de idade, com adição de amônio na solução de cultivo.

Para a análise isoenzimática, o valor de PIC variou de 0 (zero) para o alelo 5 de ACP e o alelo 3 de GOT, até 0,971 para o alelo 5 de ACP (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência e valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), para cada um dos 23 alelos isoenzimáticos analisados na caracterização de acessos de arroz vermelho (Pelotas-RS, 2005).

Sistema isoenzimático ¹	Alelo	Frequência ²	PIC
EST	1	0,176	0,824
	2	0,265	0,735
	3	0,912	0,088
	4	0,824	0,176
MDH	1	0,588	0,412
	2	0,500	0,500
	3	0,353	0,647
	4	0,647	0,353
	5	0,412	0,588
ACP	1	0,235	0,765
	2	0,088	0,912
	3	0,588	0,412
	4	0,029	0,971
	5	1,000	0,000
ADH	1	0,971	0,029
	2	0,735	0,265
GOT	1	0,971	0,029
	2	0,618	0,382
	3	1,000	0,000
GTDH	1	0,060	0,94
	2	0,559	0,441
	3	0,147	0,853
	4	0,176	0,824

¹ - EST: esterase; MDH: malato desidrogenase; ACP: fosfatase ácida; ADH: álcool desidrogenase; GOT: glutamato oxalacetato transaminase; e GTDH: glutamato desidrogenase; ² - Frequência de cada alelo na população estudada (se houver mais de dois alelos por loco e estes encontrarem-se em heterozigose, a soma destes valores por loco supera a unidade).

O cálculo deste valor em análises isoenzimáticas não tem sido muito utilizado, entretanto, gera uma informação valiosa para estudos de caracterização da variabilidade genética. O conteúdo alélico encontrado em cada sistema isoenzimático foi, em alguns casos, superior ao citado na literatura. Isso poderá ter uma relação direta com a variabilidade genética da população natural de acessos de arroz vermelho analisada.

A similaridade genética, estimada com base no coeficiente de Nei & Li (1979), variou de 0,38 até 1,00, com distância genética média de 0,70. Isso evidencia maior variabilidade genética revelada mediante a análise isoenzimática, comparada à análise de similaridade genética calculada com base em marcadores moleculares microsátélites. A análise de agrupamento mediante o método de ligação completa, e utilizando a similaridade genética média como ponto de corte para a formação dos grupos, permitiu definir sete agrupamentos de acessos. A análise de agrupamento com base em *bootstrapping*, novamente, não refletiu os agrupamentos obtidos com base na similaridade genética média como os mais consistentes. No entanto, a coincidência de agrupamentos

utilizando-se os dois critérios (similaridade genética média e *bootstrapping*) foi maior para as isoenzimas que para os marcadores microsátélite. Além disso, enquanto na análise de microsátélites obteve-se uma correlação cofenética (medida da confiabilidade no dendrograma relativamente à matriz de similaridade genética) de 0,68, na análise isoenzimática esse valor foi de 0,96. Isso evidencia que o dendrograma obtido com dados isoenzimáticos reflete de forma mais confiável os dados de similaridade genética entre os genótipos e, conseqüentemente, a formação de grupos resultante pode ser inferida com maior confiança. Contudo, para o caso das isoenzimas, nenhum acesso permaneceu formando grupo único e, sim, todos eles formando agrupamentos de pelo menos dois acessos (Figura 2). Isso pode ser devido à utilização de apenas 23 alelos isoenzimáticos na caracterização dos acessos, pois para a análise de microsátélite, o dobro do número de alelos foi identificado.

Interpretação dos dados

Ambos os sistemas de detecção de polimorfismo revelaram elevado grau de polimorfismo na população de arroz vermelho analisada. No entanto, o número e a composição genotípica de cada agrupamento obtido foram diferentes para ambos os tipos de marcadores genéticos. Provavelmente, isso seja decorrente da variação nas regiões genômicas acessadas em cada técnica. Enquanto os microsátélites revelam o polimorfismo com base em seqüências repetitivas (geralmente correspondentes a regiões do genoma que não codificam para proteínas), as isoenzimas revelam o produto direto da expressão gênica. Por outro lado, foi possível visualizar uma variação considerável na formação dos grupos, quando utilizada a similaridade genética média comparada à análise de *bootstrapping*. Infere-se que a análise de *bootstrapping* permite uma formação mais consistente de grupos do que com a utilização da similaridade genética média. Isso porque a estimativa da similaridade genética obtida por análise de *bootstrapping* não é influenciada pela dissimilaridade genética entre os acessos estudados, enquanto por similaridade genética média, a presença de um acesso muito divergente pode direcionar a média genética da população para um valor abaixo ou acima de valores observados mais frequentemente (moda).

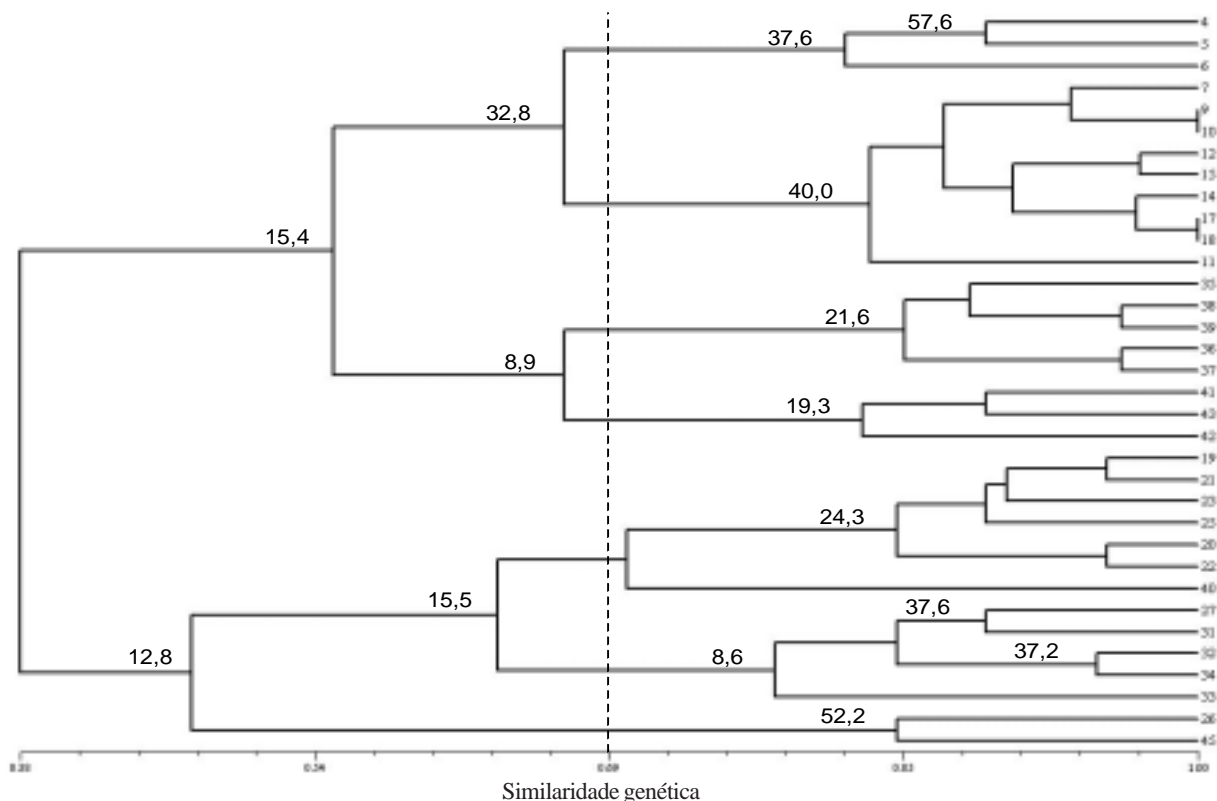


Figura 2. Dendrograma obtido com base na similaridade genético-molecular de acessos de arroz vermelho, utilizando-se 23 marcadores isoenzimáticos (o agrupamento foi obtido pelo método da ligação completa; os valores de *bootstrap* estão ao lado dos nós; e a linha pontilhada vertical indica a similaridade genética média, isto é, o ponto de corte do dendrograma para a formação dos grupos).

Numa análise mais detalhada, pode-se observar que os acessos 45 e 26 foram os únicos que apresentaram atividade para o alelo 1 da enzima glutamato desidrogenase. O elevado valor de PIC para o referido alelo (0,94) pode ter sido o fator determinante para a separação destes acessos. Da mesma forma, o acesso 45, quando analisado mediante marcadores microssatélites, apresentou três marcadores que foram exclusivos deste acesso (alelo 2 do marcador RM 202, alelo 2 do marcador RM 212 e loco 1 do marcador RM 223). Os valores de PIC (0,9706) contribuíram para que o acesso 45 formasse um grupo distinto dos demais acessos.

Do ponto de vista fisiológico, o acesso 45 apresentou desempenho superior em análises de germinação a 20 cm de profundidade (Sguarezi *et al.* 2003). Com base nisso, este acesso poderá ser utilizado em cruzamentos para a geração de populações segregantes para o caráter germinação/emergência a grandes profundidades, com o objetivo de mapear *quantitative trait loci* (QTL) associados.

CONCLUSÕES

1. A população de arroz vermelho analisada apresenta grande variabilidade genética, evidenciando sua potencialidade para o mapeamento de características de interesse à fisiologia de sementes.
2. Marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas e marcadores moleculares do tipo microssatélite são eficientes para estimar a variabilidade genética em acessos de arroz vermelho.

REFERÊNCIAS

- Akagi, H., Y. Yokozeki, A. Inagaki & T. Fujimura. 1997. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 61-67.
- Alfenas, A.C. 1998. Eletroforeses de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e

- microrganismos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 574 p.
- Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley & M.E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181-186.
- Augustin, E., F. Franco & A. Terres. 1997. Detecção de mistura varietal, e caracterização de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) através de padrões isoenzimáticos. p. 84-86. In Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, 22. Balneário Camboriú. Epagri-Irga-Embrapa/CPACT. 389 p. Anais.
- Borba, T.C.O., C. Brondani, R.P.V. Brondani & P.H.N. Rangel. Caracterização molecular de linhagens e cultivares da coleção nuclear brasileira do arroz por marcadores SSR. In Congresso Brasileiro da Cadeia Produtiva do Arroz, 2. Disponível em: http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc_196/trabalhos/CBC-TRAB_70-1.pdf. Acesso em: 12 jan. 2006.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick & R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.
- Brondani, C., R.P.V. Brondani, T.C.O. Borba, T. Brunes, P.H.N. Rangel & E.P. Guimarães. 2004. Utilização de marcadores microssatélites no melhoramento populacional do arroz em Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás. 32 p. (Documentos 169)
- Brasil. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. 1992. Regras para análise de sementes. SNDA/DNDV/CLAV, Brasília. 365 p.
- Bonow, S., E. Augustin, D.F. Franco, J.A. Peters & A.L. Terres da S. 2001. Caracterização isoenzimática de genótipos de arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36: 291-300.
- Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho & S.R. McCouch. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 553-567.
- Cho, Y.G., M.W. Blair, O. Panaud & S.R. McCouch. 1995. Cloning and mapping of variety specific rice genomic DNA sequences amplified length fragment polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome*, 39: 373-378.
- Endo, T. & H. Morishima. 1983. Rice. p. 129-146. In S.D. Tanksley & T.J. Orton. *Isozymes in plant genetics and breeding - part B*. Elsevier; Amsterdam. 472 p.
- Gealy, D., T. Tai & C. Sneller. 2002. Identification of red rice, rice and hybrid populations using microsatellite markers. *Weed Science*, 50: 333-339.
- Guidolin, A.F. 1993. Caracterização de genótipos de arroz irrigado por técnicas eletroforéticas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Pelotas, Rio Grande do Sul. 92 p.
- Henderson, S.T. & T.D. Petes. 1992. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cellular Biology*, 12: 2749-2757.
- Jackson, M.T. & R. Juggan. 1993. Sharing the diversity of rice to feed the world. *Diversity*, 9: 22-25.
- Junjian N., P.M. Colowit & D.J. Mackill, 2002. Evaluation of Genetic Diversity in Rice Subspecies Using Microsatellite Markers. *Crop Science*, 42: 601-607.
- Kanamori, T., S. Konishi & E. Tanaka. 1972. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. *Physiologia Plantarum*, 26: 1-6.
- Langevin, S., K. Clay & J. Grace. 1990. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution*, 44: 1000-1008.
- Lizhi, G., G. Song, H. Deyuan, L. Rushun, T. Guoda & X. Zaifu. 2002. Allozyme variation and conservation genetics of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Yunnan, China. *Euphytica*, 124: 273-281.
- Malone, G. & P.D. Zimmer. 2005. Marcadores Moleculares. vermelho (*Oryza sativa* L.). p.77-113. In P.D. Zimmer, A.C. Oliveira & G. Malone. Ferramentas da biotecnologia no melhoramento genético vegetal. Universitária/ UFPel, Pelotas. 158 p.
- Mackill, D.J. 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Science*, 35: 889-894.
- Nei, M. & W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings National Academic Sciences*, 76: 5269-5273.
- Ni, J., P.M. Colowit & D.J. Mackill. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. *Crop Science*, 42: 601-607.
- Olufowote J.O., Y. Xu, X. Chen, W.D. Park, H.M. Beachell, R.H. Dilday, M. Goto & S.R. McCouch. 1997. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome*, 40: 370-378.
- Panaud, O., X. Chen & S.R. McCouch. 1995 Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 38:1170-1176
- Ramirez, H., A. Calderon & W. Rocca. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. p. 825-856. In W. Rocca & L. Mroginski. Cultivo de tejidos en

- la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali. 1991. 885 p.
- Rangel, P.N., R.P.V. Brondani, C. Brondani & P.H. Rangel. 2005. Caracterização agrônômica emolecular de linhagens de arroz contendo fragmentos genômicos da espécie silvestre *Oryza glumaepatula*. Congresso Brasileiro da Cadeia Produtiva do Arroz, 2. Disponível em: http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/serie/documentos/doc_196/trabalhos/CBC-TRAB_99-1.pdf. Acesso em: 14 dez. 2005.
- Redona, E.D. & D.J. Mackill, 1996. Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 395-402.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSys-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter Publications, New York, USA.
- Saghai Maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen & D.R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA apacer - length polymorphism's in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 8014 - 8018.
- Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochemical Genetics*, 3: 37-39.
- Squarezi, C.N., S.T. Peske, V.L. Bobrowski & H.L.M. Moreira. 2003. Análise da qualidade fisiológica do arroz vermelho (*Oryza sativa* L.). *Informativo Arates*, 13: 75.
- Suh, H.S., Y.L. Sato & H. Morishima. 1997. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics*, 94: 316-321.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii & S.R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 100: 697-712.
- Virk, P.S., B.V. Ford-Lloyd, M.T. Jackson & H.J. Newbury. 1995. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity*, 74: 170-179.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Wu, X.M., C.B. Chen & D.Y. Li. 2005. Esterase isozymes in the wild rices of Guangxi. *National Agriculture Library* Disponível em: http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn3/v3I10.html. Acesso em: 7 mar. 2005.
- Wu, K.S. & S.D. Tanksley. 1993. Genetic and physical mapping of telomeres and macrosatellites of rice. *Plant Molecular Biology*, 22: 861-872.
- Yang, G.P., M.A. Maroof, C.G. Xu, Q. Zhang & R.M. Biyashev. 1994. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 245: 187-194.