

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA

E

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE RECURSOS GENÉTICOS E  
BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE PLANTAS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE VARIEDADES  
TRADICIONAIS DE ARROZ DO MARANHÃO

KELLEN MELER

PROF. ORIENTADOR PhD: RUBENS O. NODARI  
CO-ORIENTADOR PhD: MÁRCIO E. FERREIRA

FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA  
E  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE RECURSOS GENÉTICOS E  
BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE PLANTAS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE VARIEDADES  
TRADICIONAIS DE ARROZ DO MARANHÃO

KELLEN MEIER

PROF. ORIENTADOR PhD: RUBENS O. NODARI  
CO-ORIENTADOR PhD: MÁRCIO E. FERREIRA

*“Relatório de Estágio Final de Conclusão de  
Curso de Agronomia, realizado no Laboratório de  
Genética de Plantas, na EMPRAPA-  
CENARGEN, em Brasília –DF no período de 13  
de outubro a 25 de novembro de 1998”*

FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 1999.

*DIVERSIDADE GENÉTICA DE VARIEDADES  
TRADICIONAIS DE ARROZ DO MARANHÃO*

*KELEN MELER*

*Comissão julgadora:*

*Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis*

*CCA/UFSC*

*Prof. PhD. Rubens Onofre Nodari*

*CCA/UFSC*

*Eng. Agrônomo Sergio Feuser*

*CCA/UFSC*

*AOS MEUS PAIS E MEU NOIVO*

## *Agradecimento*

Agradeço ao Centro de Ciências Agrária/ Universidade Federal de Santa Catarina, em especial prof. PhD Rubens O. Nodari e Dr. Maurício S. dos Reis, também ao CENARGEN/EMBRAPA, em especial ao PhD Márcio E. Ferreira, pelo estímulo a este projeto desde a sua concepção.

Gostaria de agradecer: Andréa B. Schimit, que tornou possível a realização deste estágio, e a todos os colegas que contribuíram com discussões teóricas, práticas e convivência: Ana, André, Camila, Cláudio, Dario, Fabiane, Geni, Kleyne, Lucas, Luyan, Marcos, Márcio, Maristerra, Nei, Rosana, Rosane, Sérgio, Túlio, Veridiana, Zilneide.

E também em especial ao meus colegas de curso, aos quais sempre procuram ajudar e dar força, para que juntos conseguíssemos chegar neste dia, que para nós talvez seja o dia mais importante do curso de Agronomia.

Por último o maior agradecimento aos meus pais e ao meu noivo pelo constante apoio, paciência, amizade e companheirismo, durante todo este trabalho.

## *SUMÁRIO*

1. Introdução Geral .....	07
2. Hipóteses .....	11
3. Objetivos .....	11
4. Materiais e Métodos .....	12
4.1. Genótipos avaliados .....	12
4.2. Extração de DNA .....	16
4.3. Quantificação do DNA .....	17
4.4. Reação de PCR .....	17
4.5. Visualização dos Fragmentos Amplificados .....	18
4.6. Análise dos Dados .....	19
5. Resultados e Discussões .....	20
6. Conclusão .....	24
7. Bibliografia .....	25
8. Anexos .....	27

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é um dos alimentos mais antigos e mais importante do mundo. É fonte primária de alimento para mais de um terço da população do mundo sendo plantado em aproximadamente 148 milhões de hectares anualmente, o que corresponde a 11% da terra cultivada do mundo. Os maiores produtores concentram-se na Ásia, tendo como maior produtor mundial a China, com 187 milhões de toneladas.

O Brasil é o principal produtor da América Latina, com 55% do total (SANINT, 1997). As primeiras referências do cultivo do arroz no Brasil foram registrado em meados dos anos de 1560, e referem-se as introduções feitas pelos portugueses e holandeses (SILVA, 1969). Hoje o Estado do Maranhão é um dos principais produtores e consumidores de arroz do Brasil, possuindo longa tradição de cultivo que remonta ao período colonial. Acredita-se que houve uma grande influência africana no desenvolvimento da rizicultura no Maranhão, em parte devido ao período da escravidão, e possivelmente, pela introdução de arroz cultivado típico do Norte da África, *Oryza glaberrima*.

O arroz pertence à família *Poaceae*, subfamília *Bambusoideae*, tribo *Oryzeae* e gênero *Oryza*. Há duas espécies de arroz cultivado, *O. sativa* e *O. glaberrima*, ambas diploides ( $2n=24$ ) e constituído pelo genoma A. *O. sativa*, cultivado em todo mundo sendo o de maior importância, tem como centro de origem a Ásia, e *O. glaberrima*, originário na bacia pantanosa do rio Niger, cultivado apenas na África Ocidental (KHUSH, 1997). Existem aproximadamente 20 espécie silvestres amplamente distribuídas nos trópicos úmidos da África, Sul e Sudeste da Ásia, Sul da China, América do Sul e Central e Austrália. Comparativamente a *O. sativa*, a espécie africana é caracterizada por casca vermelha, tamanho pequeno, glumas lisas e mais fácil de ser moída mecanicamente (GRIST, 1968).

A *O. sativa*, está subdividida em diversas subespécies sendo as mais importantes: *indica* com grãos longos e finos; *japonica* com grãos curtos e arredondados; *javanica* com grãos longos e espessos (RAMOS, et al., 1981).

As variedades tradicionais de arroz cultivada pelos agricultores por gerações, constituem um dos principais reservatórios genéticos para o melhoramento das espécies devido à sua adaptação a diferentes condições de cultivo e resistência a praga e doenças. Recentemente, vem aumentando o interesse pela espécie *O. glaberrima* e espécies silvestres, pois a avaliação deste germoplasma tem revelado novas fontes de resistência a doenças e pragas, e têm sido desenvolvida técnicas e estratégias de transferência de genes entre as espécies (BRAR e KHUSH, 1997). Além do aumento do interesse nestas espécies para o melhoramento do arroz, existem também esforços para assegurar que uma grande parte da variabilidade genética dessas espécies sejam conservadas nos bancos de germoplasma do mundo (FERREIRA, M. E., comunicação pessoal).

Embora não exista dúvida de que são necessárias variedades de arroz de alta produtividade para satisfazer à demanda crescente da população, a própria atividade de melhoramento genético e o uso em larga escala de um pequeno número de variedades melhoradas vêm limitando a variabilidade genética e, conseqüentemente, incrementando o processo de erosão genética. Em diversas áreas, variedades modernas de alta produtividade foram adotadas pelos agricultores. Como conseqüência o cultivo das variedades tradicionais declinou em muitas vezes, e esta foi completamente substituída na maioria absoluta das áreas (BUSO, et al, 1998)

Com base nisso, é levantada uma questão fundamental à respeito das variedades tradicionais de arroz do Maranhão:

- Há evidência, principalmente entre os acessos coletados em antigas comunidades Quilombolas da existência de variedades de arroz da espécie *O. glaberrima* no Maranhão?

Um dos parâmetro biométrico utilizado é o estudo da diversidade genética, que pode ser empregado para estimar as relações de similaridade entre as amostras de arroz coletadas no Maranhão.

O conceito de diversidade tem sido empregado em dois sentidos distintos e complementares. O primeiro se refere a riqueza de espécies existentes em um



ecossistema (WOLDA, 1981); o segundo proposto por NEI (1973) se refere ao nível de heteroziguidade de uma população obtida a partir das frequências alélicas desta. Este valor é complemento da identidade genética, ou a probabilidade de não identidade. Assim, independente de efeitos de migração, seleção, mutação ou sistema de cruzamento, este valor permite uma idéia do nível da variação genética em uma população de uma determinada espécie.

Recentemente, uma coleta de acessos tradicionais de arroz foi realizado no Estado do Maranhão pela EMBRAPA, em colaboração com a EMAPA. Os acessos foram coletados em pequenos vilarejos e comunidades do interior do Maranhão para análise da diversidade genética.

Diversas tecnologias de biologia molecular são disponíveis, hoje, para análise genômica que possibilitem a verificação de polimorfismo de seqüência de DNA em vários pontos do genoma possibilitando uma acurada estimativa das relações de vínculo genético entre variedades de uma espécie. O código genético transcende as barreiras taxonômicas e permite que estas comparações e estimativas possam ser feitas também entre espécies (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Contudo estas técnicas permitem a obtenção de um número limitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo.

Entre as diversas classes de marcadores disponíveis, aqueles baseados na reação de polimerase em cadeia se prestam para estudos de comparações e estimativas entre espécies, envolvendo um grande número de amostras, baseados em ampla cobertura de diversos pontos do genoma. Um dos mais simples e rápido é o emprego de marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que resulta na amplificação de vários produtos de DNA numa mesma reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) apresentando grande capacidade multiplex, que permite a análise de vários locos a partir de primers arbitrários (oligonucleotídeo - seqüência de bases complementares casualizados). Cada produto é derivado de uma região do genoma que contém dois segmentos curtos homólogos ao primer, em fitas opostas de DNA e suficientemente próximos para que a amplificação ocorra. O polimorfismo é detectado com a presença ou

ausência de bandas e resultam na seqüência do local de ancoramento do primer. O uso de polimorfismo de DNA amplificado no estudos de variabilidade genética apresenta-se como uma poderosa estratégia de geração de dados que permitem: a organização de Bancos de Germoplasma, a identificação de duplicações em coleções, a estimativa de diversidade e distância genética entre acessos.

Uma desvantagem dos marcadores RAPD para o estudo genético de população é que a maioria dos alelos segregam como marcadores dominantes (WILLIAMS, et al., 1990). O fragmento amplificado reflete o estado homozigoto dominante ou heterozigoto. Nenhum fragmento produzido reflete o estado homozigoto recessivo. A ausência de amplificação podem ter distintas causas como: mutação, deleções e inserções na região de anelamento. Taís características reduzem a precisão da estimativa da freqüência de alelos necessários para análise genética em populações comparado com análises baseadas em marcadores co-dominantes. Como o arroz apresenta autofecundação, presume-se que os indivíduos de uma população são homozigotos. Assim a presença de uma banda pode ser associada a um genótipo específico. Já a ausência da banda pode ser devido a mutações, duplicações, deleções ou mesmo translocação.

Entretanto, alguns métodos indiretos são utilizados para calcular freqüência de fragmentos de RAPD e assim calcular parâmetros genéticos (LINCHE & MILLIGAN, 1994). Ambos usam a freqüência da ausência do fragmento como estimativa da freqüência do homozigoto recessivos (ISABEL, et al, 1995).

Outro método alternativo para estimar a subdivisão da diversidade com RAPD foi primeiramente usada por HUFF et al (1993) que usaram um método descrito por EXCOFFIER , et al (1992) de análise de variância molecular, no qual se obtêm estimativas de diferenciação de população. Esta análise se baseia na matriz de distância genética para estimar a distribuição da variação entre indivíduos dentro da população, entre populações dentro de regiões e entre regiões.

O estudo de populações também pode ser realizado através de índices e coeficientes que expressam o grau de similaridade e distância genética entre as

amostras analisadas. Alguns desses coeficientes se baseiam nas frequências alélicas, enquanto outros operam como frequência alélicas arbitrárias dos tipos 1 e 0, referindo-se a presença e ausência, respectivamente, de um determinado alelo (DIAS, 1998). Esses coeficientes compõem uma matriz que pode ser utilizada para mostrar uma classificação mais objetiva. Para isso, técnicas de agrupamento são aplicadas a essa matriz, um algoritmo de agrupamento por exemplo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages), é aplicada sobre essa matriz do modo a identificar e conectar grupos homogêneos, tais grupos são representados graficamente em um diagrama de árvore denominado de dendrograma (KARP, et al, 1997)

## 2. HIPÓTESES

- Algumas variedades tradicionais de arroz do Estado do Maranhão são da espécie africana domesticada *O. glaberrima*.
- A maioria das variedades tradicionais de arroz do Estado do Maranhão (>90%) compõem o *pool* gênico de arroz de sequeiro (*O. sativa* subespécie japônica).

## 3. OBJETIVOS

- Analisar uma amostra de 90 acessos tradicionais do Maranhão com o uso de marcadores moleculares - RAPD (Polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados ao acaso), com o intuito de identificar a existência de *O. glaberrima* no Maranhão.
- Estimar o nível de variabilidade genética de acessos de arroz coletados no Maranhão em relação a variedades comumente utilizadas em programas de melhoramento genético de arroz irrigado (*O. sativa* subespécie indica) e de sequeiro (*O. sativa* subespécie japônica).

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.1 Genótipos avaliados

Para a análise de variabilidade genética foi utilizada uma amostra de 90 acessos de variedades tradicionais de arroz de diferentes comunidades e vilarejos do Estado do Maranhão (Tabela. 1), distribuídas principalmente na região central e norte deste estado (Figura. 1).

Tabela. 1 – Amostras analisadas, produtores e comunidades onde foram coletados acessos de variedades tradicionais de arroz do Maranhão.

N. Ana	Ban. Lab.	Nome Comum	Comunidade	Produtor	Município
P7	903	Agulhinha vermelho	Bacabalzinho	José Inácio Lopes	Arari
P8	904	Nenezinho Vermelho	Bacabalzinho	José Inácio Lopes	Arari
P9	905	Enche Paiol	Enseada do Engenho	Francisco Campelo	Arari
P10	906	Lageado	Enseada do Engenho	Benedito Lopes	Arari
P11	907	Sorozinho Vermelho	Enseada do Engenho	Francisco de Nazaré Campelo	Arari
P12	908	Legeiro Vermelho (3 meses)	Enseada do Engenho	Francisco de Nazaré Campelo	Arari
P13	909	Arroz Comum	Bamburral	Domingos santos	Arari
P14	910	Agulhinha Vermelho	Capoeira Grande	Domingos de Souza	Arari
P15	911	Bacaba Roxo	Capoeira grande	Domingos de Souza	Arari
P16	912	Arroz comum	Capoeira Grande	Domingos de Souza	Arari
P17	913	Palha Murcha	Capoeira Grande	Levi Francisco de Souza	Arari
P18	914	Arroz 3 meses	Alto da Preguiças	Raimundo Leitão	Vitória do Mearim
P19	915	Jatobá	Boa vista	Edmar Souza Bezerra	Vitória do Mearim
P20	916	Nenezinho	Boa vista	Raimundo Brito Alves	Vitória do Mearim
P21	917	Braquiária	Boa vista	Raimundo Brito Alves	Vitória do Mearim
P22	918	Bacaba Roxo	Mato Grosso	Antônio Pedro Pereira	Vitória do Mearim
P23	919	Canela de Ferro	São Lourenço	Antônio Macial	Vitória do Mearim
P24	920	Agulhinha Branco	São Lourenço	José (Grosso)	Vitória do Mearim
P25	921	Come Cru Vermelho	Coque	Manoel Nogueira	Vitória do Mearim
P26	922	Lageado	Coque	Antônio Francisco P. Coelho	Vitória do Mearim
P27	923	Lobão	São Vicente	José Evangelista Moraes	Igarapé do Meio
P28	925	Nenezinho (3 meses)	Casa Grande	José Manoel Serra	São Vicente Férrer
P29	927	Arroz Vermelho (Inço)	Mamões	Énio Antônio Vieira	Arari
P30	928	Arroz Preto (Inço)	Mamões	Énio Antônio Vieira	Arari
P31	930	Arroz Selvagem	Santa Tereza	Oenes Barros	Viana
P32	931	Nenezinho	Estrada de Rafael	Eugênio Bispo da Luz	Viana
P33	932	Jatobá	Estrada de Rafael	José Raimundo Costa	Viana

Tabela. 1.

## Continuação

N. Ana	Ban. Lab.	Nome Comum	Comunidade	Produtor	Município
P34	933	Agulhinha Branco	Estrada de Rafael	José Antônio Martins	Viana
P35	934	Come Cru	Estrada de Rafael	Rosivaldo Mendes Coelho	Viana
P36	935	Pingo D'água	Estrada de Rafael	Raimundo da Paz Matos	Viana
P37	936	Maroca	Estrada de Rafael	Raimundo Nonato Costa	Viana
P38	937	Veneza	Arraial	Benedito Lopes	Arari
P39	938	Cacília	Guruti	Antônio Carlos A. Ribeiro	Mirinzal
P40	939	7 Semanas	Guruti	Antônio Carlos A. Ribeiro	Mirinzal
P41	940	Come Cru Vermelho	Santana	Antônio Cerearense	Santa Rita
P42	941	Come Crus Branco	Pedreiras	Raimundo José Lima Torres	Santa Rita
P43	942	Agulhinha Branco	Pedreiras	Cabuito Mendes dos Santos	Santa Rita
P44	943	Agulhinha Vermelho	Pedreiras	Cabuito Mendes dos Santos	Santa Rita
P45	944	7 Semanas	Frechal	Edvirges Silva Carneiro	Mirinzal
P46	945	Arroz Prata	Frechal	Edvirges Silva Carneiro	Mirinzal
P47	946	Arroz 90 dias	Frechal	Edvirges Silva Carneiro	Mirinzal
P48	947	Canela de Ferro	Frechal	Edvirges Silva Carneiro	Mirinzal
P49	948	Nenezinho Branco	Frechal	Edvirges Silva Carneiro	Mirinzal
P50	949	Nenezinha Vermelha	Frechal	Edvirges Silva Carneiro	Mirinzal
P51	950	Bacaba	Frechal	Edvirges Silva Carneiro	Mirinzal
P52	952	Come Cru Vermelho	Calango Novo	Antônio Paulino da Silva	Santa Inês
P53	954	Jatobá	Bom Lugar	Raimundo Pereira de Andrade	Pindaré Mirim
P54	957	Arroz Pindaré	Franco	Antônio Manoel da Conceição	Santa Inês
P55	959	Saia Velha (Arroz Vermelho)	Franco	Maria Francisca Xavier	Santa Inês
P56	961	Lageado	7 de Setembro	Ademar Gonçalves dos Santos	Santa Luzia
P57	962	Jatobá	7 de Setembro	Bernaldo Viana	Santa Luzia
P58	963	Arroz Fino	Batatal	Raimundo Valtemir Teixeira	Santa Luzia
P59	964	Cana Roxa	Jatobá	Edinaldo Costa das Chagas	Santa Luzia
P60	966	Palha Murcha	Olho D'água	Abmael Ferreira Souza	Pindaré Mirim
P61	967	Bico Ganga	Piquizeiro	Antonio Quati	Santa Inês
P62	968	Gaúcho	Olho D'água	Abmael Ferreira Sousa	Pindaré Mirim
P63	969	Pechoro	Colônia G-li	Adão	Santa Inês
P64	970	Cana Roxa	Colônia G-li	Adão	Santa Inês
P65	971	Guabiroba	Centro dos Ramos	Aginaldo Mesquita da Silva	Barra do Corda
P66	972	Agulha	Centro dos Ramos	Aginaldo Mesquita da Silva	Barra do Corda
P67	973	Palha Murcha	Centro dos Ramos	Wilson Carvalho de Souza	Barra do Corda
P68	975	Pingo D'água	Barro Branco (Tamarino)	Otacílio de Jesus Pinto	Barra do Corda
P69	976	Felismino	Clemente	José Pereira da Silva	Barra do Corda
P70	977	Arroz Ligeiro	Promissão	Emanoel Gilton de Souza	São Luís Gonzaga
P71	978	Piauí Dourado	Santo Antônio dos Costa	Roberto Corrêia	São Luís Gonzaga
P72	980	Arroz Branco	Santo Antônio dos Costa	José Bispo	São Luís Gonzaga
P73	981	Arroz Vermelho	Santo Antônio dos Costa	José Bispo	São Luís Gonzaga
P74	982	Come Cru Branco	Vale Verde	Raimundo Onésio da Silva	São Luís Gonzaga
P75	983	Lageado	Natal	Antônio Barbosa de Sousa	São Luís Gonzaga

Tabela 1.

Continuação

N. Ana	Ban. Lab.	Nome Comum	Comunidade	Produtor	Município
P76	984	Bacelar (Cabeludo)	Nova Vida	Celanzila Cardoso Vidigal	São Luís Gonzaga
P77	985	Buruti Vermelho	Boa Vista Táboa	Tomás Alves de Sousa	Bacabal
P78	986	Buruti Branco	Boa Vista Táboa	Pedro Gonçalves do Nascimento	Bacabal
P79	987	Taboca	Água Azul	Antônia de Maria B. da Silva	Vitorino Freire
P80	988	Zebu	15 de Novembro	Maria da Glória Lima	Lago do Junco
P81	989	Matão	São José do Jacú	Mateus Oliveira Pereira	D. Pedro
P82	990	Chiador	Arara	Salomão Pereira Lucena	Tuntun
P83	991	Marabá	Arara	Salomão Pereira Lucena	Tuntun
P84	992	Vermelhinho	Arara	Salomão Pereira Lucena	Tuntun
P85	993	Arroz Asa	Centro de Sinhá	Antônio Oliveira Alves	Presidente Dutra
P86	994	Cedoze	Centro de Sinhá	Antônio Oliveira Alves	Presidente Dutra
P87	995	Ligeiro	Centro de Sinhá	Antônio Oliveira Alves	Presidente Dutra
P88	996	Buriti	Centro de Sinhá	Antônio Oliveira Alves	Presidente Dutra
P89	997	Lageado	Centro de Sinhá	Antônio Oliveira Alves	Presidente Dutra
P90	999	Aguilha Ligeiro	Califórnia	Francisco Machado de Andrade	Capinzal do Norte
P91	1000	Comum Legítimo	Califórnia	Francisco Machado de Andrade	Capinzal do Norte
P92	1001	Bacaba Maruim	Companhia	Pedro Agenir Pereira	Itapecuru Mirim
P93	1003	Arroz Preto	Companhia	Pedro Agenir Pereira	Itapecuru Mirim
P94	1004	Cana Roxa	Pindoal	Francisco da Silva	Miranda do Norte
P95	1005	Come Cru Branco	Companhia	Joaquim Pareira Martins	Tapucuri Mirim
P96	1006	Bicú	Companhia	Joaquim Pareira Martins	Itapecuru Mirim

Foram utilizados seis acessos como controle: as variedades de arroz do sequeiro, IAC 25 e Araguaia (*O. sativa* subespécie japônica); as variedades de arroz irrigado, CICA 8 e BR IRGA 409 (*O. sativa*, subespécie indica); arroz cultivado no Norte da África (*O. glaberrima*) e arroz silvestre (*O. glumaepatula*), coletado na Amazônia.



Figura 1 - Pontos de Coletas das variedades de arroz tradicionais do Estado do Maranhão.

## 4.2. Extração de DNA

O método de extração utilizado foi descrito por FERREIRA & GRATTAGAGLIA (1995). As sementes foram coletadas e armazenadas em câmara fria a  $-4^{\circ}\text{C}$ , até a extração.

Para extração de DNA foi utilizado um *Bulk* de 10 sementes de cada acesso, onde foram colocados em microtudos de centrifuga (2,0 ml), na qual haviam esferas com diâmetro de 20 mm e 40 mm. Foram adicionados aos tubos 700  $\mu\text{l}$  de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 % PVP-40 e 0,2% B-mercaptoetanol). Logo após os tubos foram colocados na máquina Fast Prep-BIO 101, que por centrifugação faz a extração, em 4 ciclos de 40 segundos cada.

Em seguida foram colocados por 60 minutos em banho-maria, a  $65^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, os tubos foram retirados do banho-maria, e colocados em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 600  $\mu\text{l}$  de CIA (Cloroformio-álcool isoamílico, 24:1) um solvente orgânico.

Os tubos foram agitados por inversão, durante aproximadamente 5 minutos, sendo então centrifugados a 12000 rpm, durante 15 minutos, para obtenção de uma emulsão homogênea e a separação de fases. Após a centrifugação, foi retirado cuidadosamente a fase superior, aproximadamente 600  $\mu\text{l}$ , a qual foi transferida para um novo microtubo. À fase aquosa foi adicionado 400  $\mu\text{l}$  de isopropanol frio ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), e misture cuidadosamente, para precipitar os ácidos nucleicos. Os materiais foram colocados a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 15 horas.

O DNA precipitado foi centrifugado a 7000 rpm, durante aproximadamente 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado, havendo o cuidado para que não fosse perdido o *pellet*. O *pellet* foi lavado uma vez com 1 ml de etanol 70 % durante 10 minutos, aproximadamente, e posteriormente retirado o etanol. Foi realizado uma lavagem com 1 ml de etanol absoluto, durante aproximadamente 5 minutos. O *pellet* foi desidratado em liofilizador (*speed vac*), durante 10 minutos e ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA) contendo 10



ug/ml de RNase, e deixado em temperatura ambiente por aproximadamente 15 horas para que houvesse a digestão do RNA.

#### 4.3. *Quantificação do DNA*

Para estimar a concentração do DNA extraído e conseqüentemente a qualidade do DNA extraído, foi feita uma eletroforese em gel de agarose (1 % com Brometo de etídio), tendo como padrões DNA de Fago Lambda, nas concentrações de 100, 200 e 500 ng /ul. O gel foi carregado com 5 ul de uma solução estoque de Tampão de Carregamento [20 ml de TE, pH 8,0; 8 gramas de sacarose; 50 mg de azul de bromofenol; 400 ul de Brometo de Etídio (1 mg/ml) e 1 ul de água].

Após se estimar a concentração do DNA, o mesmo foi diluído em água, para uma concentração de 2,5 ng/ul e requantificado com eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 4.4. *Reação de PCR*

O protocolo de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) foi utilizado conforme FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1995). Para a reação de amplificação foi utilizado um coquetel de reagentes, num total de 10,10 ul [3,46 ul de água; 1,0 ul BSA (1 mg/ml); 1,3 ul Tampão 10 x (15 mM MgCl<sub>2</sub>); 1,14 ul de dNTPs (2,5 mM); 3 ul de primer (10 ng/ul) e 1 U *Taq* DNA polimerase (5 U/ul – Cenbiot/RS)] e 3 ul de DNA (2,5 ng/ul). Sobre a reação foram adicionados 50 ul de óleo mineral. Para análise da variabilidade genética de arroz foram utilizado 42 primers (Tabela 2), selecionados a partir de experimentos anteriores com variedades de arroz.

Tabela 2 – Listagem dos primers Operon utilizados para a análise da diversidade genética em variedades tradicionais de arroz do Maranhão.

Primers			
OPA 01	OPAB 11	OPN 05	OPW 03
OPAB 01	OPAB 12	OPN 07	OPW 10
OPAB 02	OPAB 13	OPN 14	OPW 17
OPAB 03	OPAB 14	OPN 18	OPW 18
OPAB 04	OPAB 15	OPN 20	OPW 19
OPAB 05	OPAB 16	OPR 06	OPW 20
OPAB 06	OPAB 17	OPR 12	OPK 04
OPAB 07	OPAB 18	OPX 03	OPG 10
OPAB 08	OPAB 19	OPX 04	
OPAB 09	OPAB 20	OPX 20	
OPAB 10	OPD 08	OPW 02	

A reação foi feita em termociclador PTC – 100 (Programmable Thermal Controlle). No programa de amplificação foi utilizado o indicado no protocolo de WILLIAMS, et al., (1990): 1 minuto a 92 °C (desnaturação); 1 minuto a 35 °C (anelamento do primer); 2 minuto a 72 °C (extensão pela *Taq* polimerase e incorporação de nucleotídios), por ciclo, repetido 40 ciclos. Após os 40 ciclos, a reação foi submetida por 5 minutos a 72 °C para a finalização do produto da amplificação. O tempo de duração do programa foi de aproximadamente 4 h e 15 minutos.

#### 4.5. Visualização dos Fragmentos Amplificados

Para a visualização e separação dos fragmentos amplificados usou-se eletroforese horizontal em gel submarino de agarose a 1,5 %, contendo 3 ul Brometo de Etídio .

Em cada reação foi adicionado 2 ul de tampão de carregamento, após aplicado no gel, totalizando aproximadamente 18 ul de reação. Foram utilizados

padrões de fragmentos de tamanho conhecido. A corrida de eletroforese foi conduzida sob voltagem constante de 120 volts e amperagem constante de 150 mA em tampão 1 x TBE (13,5 gramas de Tris-Base; 6,87 gramas de Ácido bórico; 5ml de 0,5 EDTA, pH 8,0), por aproximadamente 5 horas.

Os géis foram visualizados em transluminador de luz U.V., onde foram digitalizados em sistema computadorizado (*Eagle Eye II Stratagene*) e fotografados para posterior análise.

#### 4.6. *Análise dos dados*

Para a análise da diversidade genética de variedades de arroz tradicionais do Maranhão foram selecionados aqueles que apresentavam nitidez e consistência nas reações repetidas realizada com base nas fotografias e na digitalização dos géis,

Para a análise estatística, foram estimados o coeficiente de similaridade genética entre os acessos e análise de coordenadas principais, onde foram estimadas as distâncias genéticas entre cada par de acessos estudados. Estas estimativas foram baseadas no polimorfismo exibido por cada um dos 42 primer Operon computados como presença (1) e ausência (0) de banda. A matriz de similaridade foi gerada usando o coeficiente de Jaccard, comparando todos os genótipos entre si, avaliando três tipos de informações em relação aos marcadores binários gerados:  $J = (a / a + b + c)$ , onde "a" corresponde ao número de marcadores presentes em ambos os indivíduos, "b" representa presença no primeiro e ausência no segundo e "c" representa ausência no primeiro e presença no segundo.

O índice de análise do agrupamento hierárquico aglomerativo foi desenvolvida por UPGMA (Unweightes Pair Group Method, Arithmetic Average), que considera a média dos valores da matriz de similaridade e está apresentada na forma de dendrograma após análise de coordenadas parciais. O programa de software utilizado para a análise dos dados foi FITOPAC (SHEPHAD, G. s. d.)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos 42 primers utilizados para a análise da variabilidade em variedades tradicionais de arroz do Maranhão, apenas 34 primers apresentaram boa resolução de interpretação. Estes primers amplificaram 379 fragmentos de RAPD, dos quais 172 (45,38%) apresentaram polimorfismo (Tabela 3), média de 5,05 fragmentos por primer. Este resultado demonstrou grande capacidade de detecção de polimorfismo dos marcadores de RAPD nestes genótipos de arroz.

Para essa análise de diversidade genética em variedades tradicionais de arroz alguns primers apresentaram grande número de bandas amplificadas mais com pouco polimorfismo. Assim, o primer OPK 04 apresentou, 16 bandas, sendo que dessas, duas detectaram polimorfismo. Outro primer, o OPAB 11, amplificou 11 bandas sendo que 08 foram polimórficas, constituindo-se num bom primer para a análise (Figura 2.)

Tabela 3. – Listagem dos primers utilizados, números de ampliações por primer, número de bandas polimórficas por primer para os acessos de arroz do Maranhão.

Primer	Número de Bandas Amplificadas	Número de Bandas Polimórficas	Primer	Número de Bandas Amplificadas	Número de Bandas Polimórficas
OPA 01	09	02	OPK 04	16	02
OPAB 01	11	07	OPN 05	15	05
OPAB 02	12	03	OPN 07	15	05
OPAB 03	08	06	OPN 14	11	08
OPAB 04	11	06	OPN 18	12	06
OPAB 05	10	04	OPN 20	10	05
OPAB 06	08	01	OPR 06	08	07
OPAB 07	15	09	OPR 12	11	03
OPAB 08	11	04	OPW 02	14	10
OPAB 09	08	03	OPW 03	10	02
OPAB 10	06	03	OPW 10	10	06
OPAB 14	08	04	OPW 18	15	07
OPAB 15	03	01	OPW 20	05	01
OPAB 16	11	04	OPX 03	11	05
OPAB 17	10	05	OPX 04	12	08
OPAB 18	15	08	OPX 20	12	10
OPAB 19	12	08	OPAB 11	11	08
OPD 08	13	09			
OPG 10	11	01			

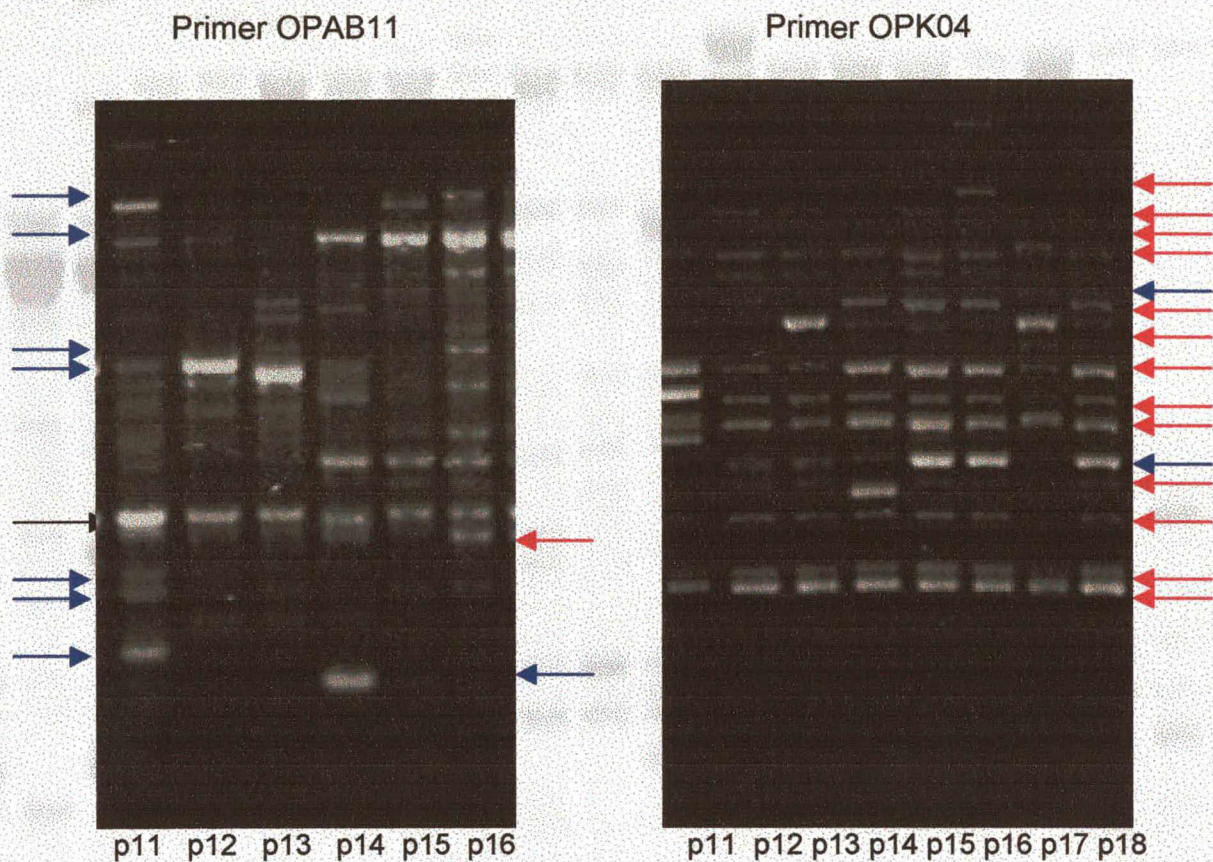


Figura 2. Padrões de bandas amplificadas pelos primers OPAB 11 e OP K 4 em DNA extraídos de variedade tradicionais de arroz do Maranhão.

Na Figura 3 mostra os padrões do polimorfismo de fragmento de DNA amplificado ao acaso (RAPD) em reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando o primer OPW02, em gel de agarose 1,5%.

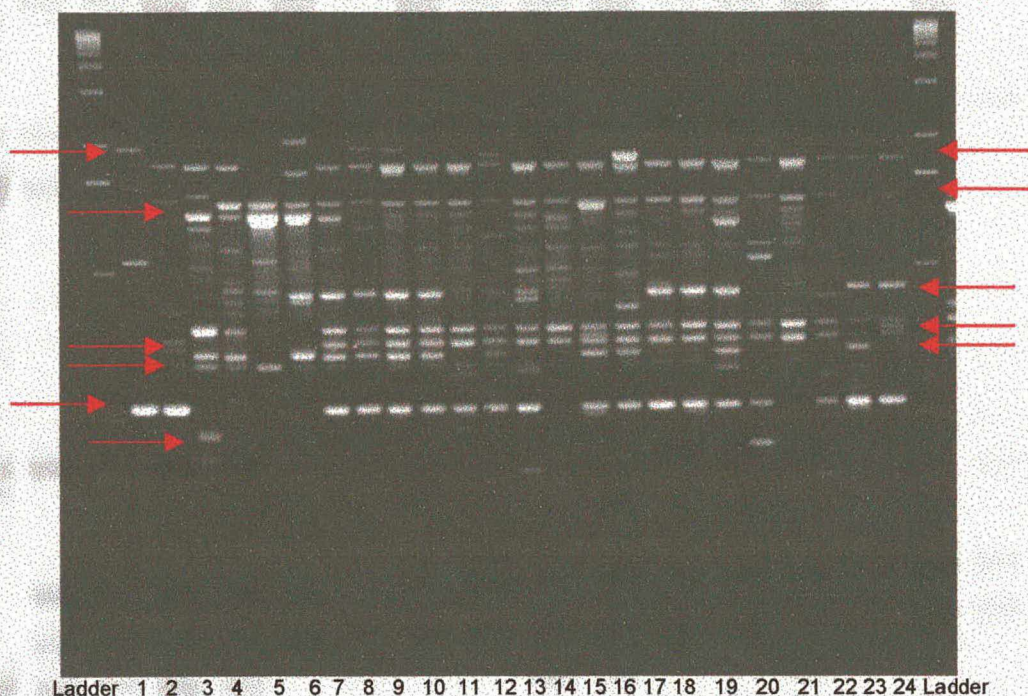


Figura 3 – Padrão de Polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) em reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando o primer OPW 02, em gel de agarose 1,5 %. Linhas: 1 -IAC 25; 2 - ARAGUAIA; 3 - *O. glaberrima* ; 4 - *O. glumaepatula* ; 5 - CICA – 8; 6 - BR IRGA 409; 7-24 - variedades de arroz do Maranhão.

A análise de agrupamento baseado em UPGMA utilizando o índice de Jaccard permitiu a formação do dendrograma (Figura 4). E através deste se observou que a espécie *O. glaberrima* formou um grupo coeso e com baixa similaridade (40 – 45%) com outros acessos. Além disso pode se observar que *O. glumepatula* também é geneticamente distante das outras espécies de arroz tradicional do estado do Maranhão. Os resultados também mostraram que o *O. glumaepatuala* tem afinidade próxima com a espécie africana *O. glaberrima*, confirmando os resultados obtidos por BUSO et al (1998).

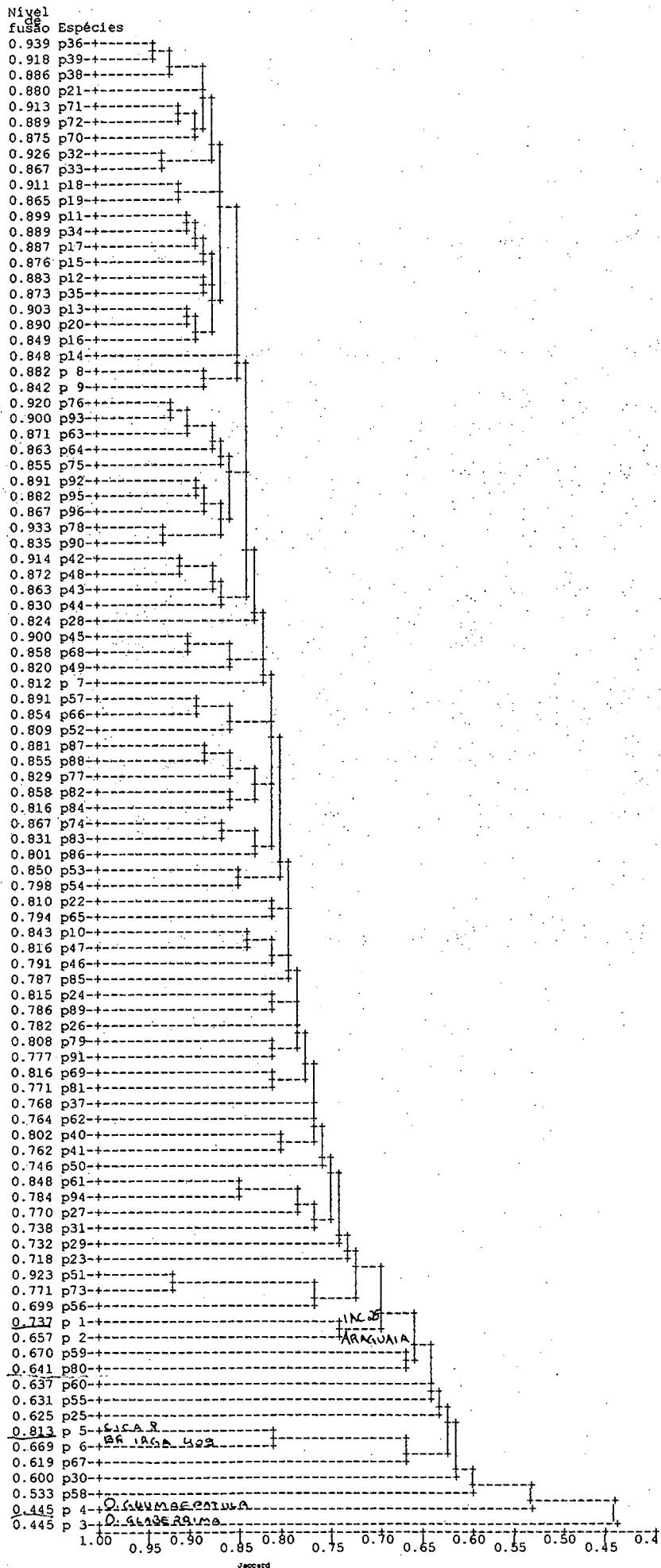


Figura 4. Similaridade genética existente entre os genótipos de arroz avaliados no teste identidade. 23

Embora muitas variedades foram coletadas na mesma região geográfica, em geral existe pouca relação entre as distâncias genéticas e distância geográfica entre as variedades tradicionais de arroz do Maranhão.

As amostras p58, p30, p57, p25, p55 e p60 são distintas geneticamente das outras amostras, e também geneticamente distintas entre si, formando cada amostra um grupo.

Alguns dos acessos apresentaram bandas semelhante ao *O. glaberrima* (1,2,26,29,30,31,46, 47, 52, 62,67 com uma banda, 5 e 66 com duas bandas) (Anexos 1). Indicando que possa ter havido cruzamentos naturais entre as duas espécies. SECOND (1985) observou a campo a existência espontânea de híbridos entre *O. glaberrima* e *O. sativa* sem grandes dificuldade E a germinação dos híbridos também normal com 90% de sucesso (NAYAR, 1973).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com base nesse marcadores, indicam que não existe a espécie *O. glaberrima* no Estado do Maranhão e confirmam que a maioria das variedades tradicionais de arroz do Estado do Maranhão compõem o *pool gênico* de arroz de sequeiro (*O. sativa* subespécie *Japonica*).

Com a técnica RAPD não pode se concluir que as regiões encontrada em alguns dos acesso são específicas do africano. Estes acessos terão ser estudados utilizando outros marcadores, pois esses dados podem fornecer informações interessantes, que podem ser úteis no entendimento da existência do arroz africano (*O. glaberrima*) no Brasil.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- BRAR, D. S.; KRUSH, G.S. *Alien introgression in rice* **Plant Mol. Biol.** 35:35-47 1997
- ✓ BUSO, G. S. C.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E. *Analysis of genetic variability of South American wild rice population (Oryza glumaepatula) with isozymes and RAPD markers.* **Mol. Ecol.** 7:107-117 1998
- CARNEY, J. A. *The African Origins of Rice Cultivation in the Americas* Los Angeles C.A. EUA 1997
- ✓ EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites* **Genetics** 131:479-491 1992
- ✓ FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.; *Introdução ao uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética* 2º ed. Brasília 220p 1996
- ✓ GRIST, D.H.; *Rice* Longmans, London 1968
- ✓ HUFF, D.R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. *RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [Bucloe dactyloides (utt.) Engelm.]* **Theor. Appl. Genet.** 86:927-934 1993
- ✓ ISABEL, N.; BEAULIEU, J.; BOUSQUET, J. *Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data and enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:6369-6373 1995
- ✓ KHUSH, S. G.; *Origin, Dispersal, Cultivation and Variation of Rice* **Plant Molecular Biology** 35: 24-35 1997
- ✓ LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. *Analysis of Population Genetic Structure with RAPD markers* **Molecular Ecology** 3:91-99 1994
- ✓ NAYAR, N.M. *Origin and cytogenetics of rice* **Adv. Genet.** 17:153-292 1973
- ✓ NEI, M.; *Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations* **Proc Nat Acad Sci USA** 70 (12) 3321-3 1973
- NODARI, R.O. *Apostila de Biotecnologia* 3 ed. Florianópolis – SC 1998

- RAMOS, M.G.; *Manual de Produção do Arroz Irrigado*. Boletim Técnico 270 EMPASC/ACARESC Florianópolis 225p. 1981
- SANINT, L. R. *Evolución Tecnológica, Perspectivas Futuras y Situación Mundial del Arroz* In: XXII Reunión da Cultura de Arroz Irrigado, 1997. Balneário Camboriú SC *Palestras ... Itajai EPAGRI* 97p 1997
- ✓SECOND, G.A *A new insight into the genome differentiation in Oryza L. through isozymic studic* . In: SHARMA, A.K.; SHARMA, A. (eds.). *Advances in chromosome and cell genetics*. Oxford & IBH Publishing CO., New Delhi pp 45-78 1985
- ✓SHEPHAD, G.; *Programa Matriz* São Paulo s.d.
- ✓SHEPHAD, G.; *Programa Cluster* São Paulo s.d.
- ✓SHEPHAD, G.; *Programa Coef* São Paulo s.d.
- ✓SILVA, M.V.; *A Cultura do Arroz* Livraria Clássica Editora 1969
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. ; *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers* *Nucleic Acids Research* Vol 18 nº 24 7213-7218 1990
- ✓WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. *DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers* *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535 1990
- ✓WOLDA, H. *Similarity Indices, Sample Size and Diversity* *Oecologia* 50:296-302 1981

## *ANEXOS*

























ANEXO 1 - CONT. - Freqüência alélica nas variedades de arroz tradicionais do Maranhão

Primer	Banda	63	93	76	9	8	14	16	20	13	35	12	15	17	34	11	19	18	33	32	70	72	71	21	38	39	36
OPD08	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
	8	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPG10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPK 04	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPN05	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPN07	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPN14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1	1	0	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPN18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPN20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1





