

# USO DE RAPD PARA ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM ARROZ

ELISANGELA SOUSA DE ARAUJO<sup>1</sup>; ANDRÉ MARQUES DOS SANTOS<sup>1</sup>; ROGÉRIA GREGIO DE BIASE MARTINS AREIAS<sup>2</sup>; SONIA REGINA DE SOUZA<sup>3</sup> (PQ) & MANLIO SILVESTRE FERNANDES<sup>4</sup> (IA)

1. Bolsista de Pós-graduação/Doutorado CAPES, Discente do CPGA-CS; 2. Bolsista de Pós-graduação/Mestrado CAPES, Discente do CPGA-CS; 3. Professor do Departamento de Química da UFRuralRJ; 4. Professor do Departamento de Solos da UFRuralRJ, CEP: 23890-000, Seropédica - RJ.

## RESUMO

Marcadores moleculares exercem uma importante função no melhoramento vegetal, permitindo o conhecimento da variabilidade genética e identificação em níveis genéticos intra e interespecíficos. Neste trabalho verificou-se o uso da técnica de RAPD para estudos de diversidade genética em arroz. Nos Kits da Enzima Taq Polimerase (PROMEGA) testados, o Kit A não propiciou um resultado satisfatório, porém no uso do Kit B houve uma maior eficiência na atividade da enzima, resultando em maiores e melhores produtos de amplificação. A técnica de RAPD mostrou-se muito eficiente para o estudo da diversidade revelando nessas variedades um material genético bem diversificado.

**Palavras-chave:** marcadores moleculares, polimorfismo, *Oryza sativa*.

## ABSTRACT

### RAPD USE FOR DIVERSITY ANALYSIS IN RICE

Molecular markers play an important function on crop breeding, allowing the knowledge of the genetic variability and identification inter and intraspecific genetic levels. In this paper was verified the use of the RAPD technique for studies of genetic diversity in rice. The Taq Polymerase enzyme Kits (PROMEGA) tested, Kit A didn't give a higher efficiency but Kit B with greater enzyme activity, yield higher and better amplification products. The RAPD technique was shown to be very efficient for the diversity study revealing great genetic variability in the plant material tested.

**Key words:** molecular markers, polymorphism, *Oryza sativa*.

## INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares constituem regiões do genoma possíveis de serem detectadas e cuja presença ou ausência pode caracterizar um organismo cuja sequência e função, na maioria das vezes, são desconhecidas (Gostimsky *et al.*, 1999). Inúmeras técnicas têm sido usadas na detecção de variabilidade genética ou polimorfismo genético em organismos.

Nas plantas, exercem uma importante função no mapeamento cromossômico, identificação e clonagem de genes, melhoramento e criação de novas variedades, permitindo o conhecimento da variabilidade genética e identificação em níveis genéticos intra e interespecíficos (Willians *et al.*, 1993; Gostimsky *et al.*, 1999).

As principais técnicas que são utilizadas na análise genética de plantas são: isoenzimas, RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) microssatélites (SSR), AFLP (Polimorfismo de

Comprimentos de Fragmentos Amplificados) e RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) entre outras.

De maneira geral, as técnicas de marcadores moleculares estão sendo utilizadas na caracterização e discriminação genotípica e identificação de marcadores ligados às características desejáveis em vegetais (Silva, 1999). Também possibilitam marcar características de efeito poligênico, por não sofrerem a interferência do ambiente, pois existem espécies que necessitam de décadas de experimentos para se obter uma informação melhorada. O nível de polimorfismo dos marcadores moleculares é geralmente alto para cada loco estudado, enquanto os marcadores morfológicos possuem baixo nível de polimorfismo (Kongkiatngam *et al.*, 1995).

Cada indivíduo possui uma sequência característica de nucleotídeos que compõem o seu DNA. As diferenças entre suas sequências, sejam através de polimorfismo de fragmentos de DNA, ou polimorfismo enzimático, revela um padrão único, uma

impressão digital genética, que pode ser útil como identidade do indivíduo (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A técnica de RAPD baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de iniciadores (pequenas seqüências complementares de DNA) que se anelam nos dois extremos opostos de uma fita de DNA que serve como molde. Nesta, utiliza-se apenas um único primer ao invés de um par, como na PCR e esse primer tem sua seqüência arbitrária, e portanto sua seqüência alvo é desconhecida

Verma, *et al.* (1999), através da técnica de RAPD, conseguiram diferenciar variedades locais de arroz da Índia. Enquanto, ISHII, em 1996, estudando a divergência genética entre variedades de arroz na Ásia, conseguiu identificar o grau de parentesco e grupo precursor de *Oryza sativa* e de *Oryza glaberrima*. O conhecimento do polimorfismo através da técnica de RAPD pode ser usado para identificação e classificação de diferentes variedades com respeito ao nível de sua similaridade genética

Semelhante aos outros cereais, o genoma do arroz é rico em guanina e citosina (GC). Cerca de 50% é composto de DNA repetido o que favorece o uso da técnica de RAPD, que é baseada no uso de um *iniciador* composto de 10 pares de nucleotídeos de seqüência arbitrária constituído de aproximadamente 50-70% de GC.

É importante salientar, que para a utilização da técnica de RAPD é necessário uma eficiente extração de DNA. Por isso, vários protocolos foram desenvolvidos e podem ser utilizados, adequando-se especificamente à espécie em estudo. Os mais comumente utilizados para os vegetais são os baseados na solução tampão de extração CTAB ("cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromid"). Este método de extração é bastante eficiente para espécies de nabo, milho e arroz, entre outras espécies (Willians, *et al.*, 1993).

A reprodutibilidade dos resultados requer uma otimização e estrito controle das condições de reação, considerados pontos chave, juntamente com a concentração de DNA. A concentração de magnésio, enzima DNA polimerase, temperatura de anelamento e qualidade da agarose, também podem afetar o número de ampliações bem como, sua intensidade e sua separação (Gostinski *et al.*, 1999; Willians *et al.*, 1993). Sob baixas temperaturas de anelamento (30-35°C), os iniciadores ligam-se a certas seqüências de DNA localizados na fita oposta à do DNA genômico. Ao utilizar-se ciclos rápidos e com mudanças de temperaturas entre as etapas de anelamento e extensão, as bandas no gel podem ser perdidas ou ficarem menos intensas (Grattapaglia e Ferreira, 1998).

As melhores concentrações para os iniciadores estão entre 0,1 e 2,0 mM. Em baixas concentrações os produtos de amplificação podem não ser detectados em gel de agarose e em altas concentrações as bandas ficam manchadas (Willians, *et al.*, 1993). Os pareamentos GC (guanina-citosina) são os mais

estáveis que AT (adenina-timina) o que afeta diretamente o tempo de residência do iniciador no sítio de amplificação. Se este tempo for curto, a estabilização do pareamento do iniciador com o sítio de iniciação no DNA é prejudicada. Conseqüentemente, o segmento não será amplificado ou irá gerar uma banda fraca no gel.

Este trabalho teve por objetivo utilizar a técnica de RAPD para estudos de diversidade genética em arroz

## MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de arroz oriundas do Estado do Maranhão foram fumigadas com sulfito de alumínio e após, esterilizadas em solução a 5% de hipoclorito de sódio, lavadas e germinadas em placa de Petri com água destilada. Após a germinação das sementes, as plântulas foram transferidas para uma solução de CaSO<sub>4</sub> 0,5mM. Com idade de aproximadamente 15 dias, amostras de folhas de cada variedade foram utilizadas para a extração de DNA em solução tampão CTAB (Grattapaglia e Ferreira, 1998).

A extração do DNA foi verificada em gel de agarose (1%) submetido a uma voltagem de 100V por 30 min., e, posteriormente corado em solução de brometo de etídio (5mg/mL), lavado em água destilada e visualizado por meio de um transluminador UV.

A técnica da RAPD segundo Willians, *et al.* (1990) teve um volume final de 16 mL, contendo 1,2 x de Tampão 10 x (Kit Promega), 2,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 Mm de cada dNTP, 0,2 mm do primer, 3mg/mL de BSA, 1,0 unidade Taq polimerase, 17 ng de DNA molde, completando o volume final com água ultra pura.

Além das concentrações dos reagentes foram testados dois Kits (**A** e **B**) que acompanham a enzima Taq polimerase produzidos pela Promega. A reação foi constituída dos seguintes ciclos: 94°C durante cinco minutos (desnaturação inicial), seguidos de 45 ciclos de: 30 segundos a 94°C (desnaturação); 35°C durante 1 min.(anelamento); 72°C durante 2 min.(extensão).

Após os 45 ciclos, a extensão foi complementada com 72°C por cinco min. Foram utilizados 20 iniciadores da Operon Technologies, Kit A, com conteúdo GC de 60 a 70% de seqüência. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% em solução tampão TBE 0,5x com voltagem de 100V por 2 horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para otimização da reação foram testadas concentrações de DNA das variedades de 5, 10 e 15 e 17ng; da enzima Taq Polimerase de 1 e 1,25 unidades e 3mg/mL

BSA (albumina de soro bovino) e comparou-se nestas mesmas condições os Kits da Operon A e B. Os melhores produtos de amplificação foram observados com a concentração da enzima Taq Polimerase 1,00 unidade. O uso de BSA foi decisivo para o sucesso da técnica, pois este melhora a eficiência da amplificação quando o DNA não é muito puro (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

No teste dos Kits da Promega, a Enzima Taq Polimerase do Kit A (50mM tris-HCl/pH8,0 a 25°C, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glicerol, 1% triton X-100e 0,5% tween), não propiciou um resultado satisfatório, pois nem todas as amostras tiveram seu DNA amplificado, porém no uso do Kit B (20mM tris-HCl/pH8,0 a 25°C, 100mM KCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glicerol, 1% triton X-100), houve uma maior eficiência na atividade da enzima DNA polimerase, resultando em maiores produtos de amplificação bem como bandas mais fortes e fáceis de serem detectadas e analisadas, fortalecendo assim a importância da solução tampão de acondicionamento da enzima Taq polimerase, que pode influenciar nas quantidades ou ausência dos produtos de amplificação para a técnica de RAPD (Figura 1).



**Figura 1-** Gel de agarose comparando os Kits A e B da Promega. 1: Lageado - OPA10, 2: Lageado Liso - OPA10; 3: Lageado - OPA3, 4: Lageado liso - OPA3.

Dos 20 iniciadores testados apenas cinco foram selecionados para o estudo de diversidade entre os genótipos de arroz. O critério utilizado foi, a presença de bandas polimórficas que obtivessem uma melhor qualidade e visualização dos produtos de amplificação para serem posteriormente analisados.

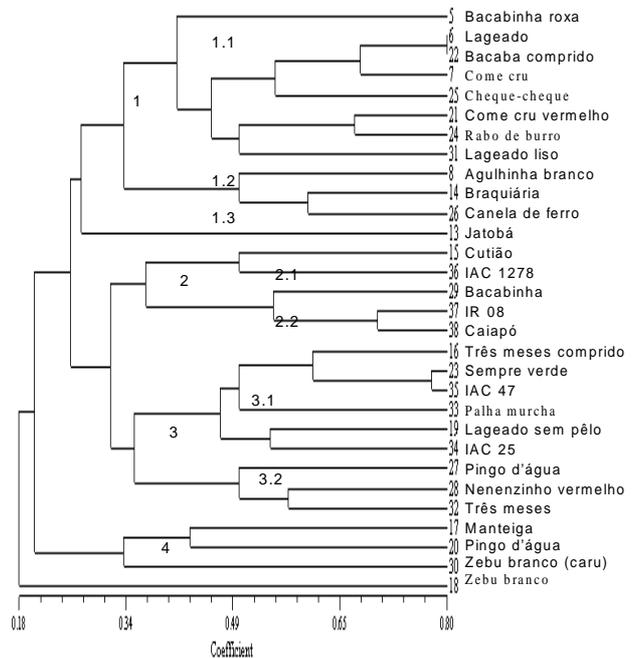
Os iniciadores selecionados foram A03, A04, A05 A10 e A18. O número de bandas polimórficas ficou em torno de 32 e, sete foram de bandas não polimórficas. O número de bandas formado em cada reação de amplificação independe do tamanho do genoma analisado (Willians *et al.*, 1993), sendo os iniciadores A03 e A04 os que geraram um maior número de produto de amplificação, ou seja, 10 fragmentos cada.

A natureza do polimorfismo da RAPD depende dos tipos de iniciadores utilizados e seus produtos de amplificação. Quanto maior for esse número,

maiores serão as chances de se detectar polimorfismo e conseqüentemente os resultados serão mais confiáveis.

No dendrograma obtido, considerando um índice de similaridade de 30%, podemos verificar que a árvore encontra-se dividida em 4 grupos.

O grupo 1, possui três ramificações, quando consideramos um índice de similaridade de 50%.



**Figura 2-** Dendrograma de similaridade genética, obtido a partir dos produtos de amplificação por RAPD para 30 genótipos de arroz.

O grupo 2 ficou constituído de cinco variedades, destas, três são variedades melhoradas, revelando uma similaridade ou progenitor comum entre elas, provavelmente usado durante o desenvolvimento. Também no grupo 3, foram agrupadas duas variedades melhoradas num total de nove. Neste grupo encontram-se duas variedades de nomes semelhantes, que são Três meses e Três meses comprido. A variedade Sempre verde apresentou uma similaridade acima de 70% com a melhorada IAC 47.

Finalmente, o grupo 4, o último e menor dos grupos formados, consistiu das variedades Manteiga, Pingo d'água e Zebu branco (caru).

A forma de agrupamento das variedades, não coincidiu com as características morfológicas, indicando um agrupamento por outras características que não a de subespécie *indica* e *japônica* como observado por Zeng *et al.* (2001).

No entanto, resultados semelhantes aos nossos foram observados por Dahlberg *et al.* (2002) ao estudarem a diversidade genética em sorgo através das características morfológicas e moleculares-RAPD não obtendo dendrogramas semelhantes, pois os

primers de seqüência arbitrária geram produtos de amplificação de regiões aleatórias do genoma.

## CONCLUSÃO

A técnica de RAPD mostrou-se muito eficiente para o estudo da diversidade genética, revelando nessas variedades do Maranhão um material genético bem diversificado.

Para o sucesso da RAPD, além de testar as concentrações dos reagentes, deve-se também atentar para o tipo de solução em que a enzima Taq polimerase é acondicionada. O Kit B da Promega foi decisivo para o desenvolvimento deste trabalho, pois, proporcionou um maior número de produtos amplificados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAHLBERG, J. A.; ZHANG X.; HART G. E.; MULLET J. E. Comparative assesment of variation Sorghum germplasm accessions using seed morphology and RAPD measurements. *Crop Science*. vol. 42, p.291-296, 2002.
- GOTMISKY, S. A.; KOKAEVA Z. G.; BOBROVA V. K. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. *Res. Journal. Genetics*. v. 11, n.35, p. 1538- 49,1999.
- GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M. E. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEM, 1998.
- ISHII, T.; NAKAMO, T.; MAEDA, N., KAMIJIMA. Phylogenetic relationships in A-genome species of rice as revealed by RAPD analysis. *Genes Gene Syst*, aug v. 71, n.4, p. 196-201, 1996.
- KOKAEVA, Z. G., BOBROVA, V. K. PETROVA, T. V. Genetic polymorphism of pea varieties, lines, and mutant revealed by RAPD analysis, *Genetika* (Moscow), v.34, n. 6, p. 771-777, 1998.
- KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M. J.; FORTIN, M. G. Genetic variation within between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme and RAPD markers. *Euphitica*. vol. 84, n.1, p. 237-246, 1995.
- NOVY, R. C.; KOBAK, C.; GOFFREDA, J.; VORSA, N. RAPDs identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) Pursh. *Theor. Appl. Genet.* vol. 88, p. 1004-10, 1994.
- QIAN, W.; GE, S.; HONG, D. Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 102, p.440-49, 2001.
- RAFALSKI, J. A. TINGEY, S. V. Genetic diagnostics in plant-breeding- RAPDs. Microsatellites and machines. *Trends genet.* Ago v. 9, n.8, p.275-80, 1993.
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter software, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. 1989, 123p.
- SILVA, A. T. Estudo da divergência genética em acessos de arroz através de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD). Lavras: UFLA, 1999. 185 p.
- SING, A. K.; SINGH, S. B.; SINGH, S. M. Genetic divergence in scented and fine genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Agriculturae Research*. vol. 17, n. 2, p.163-66, 1996.
- THOMAS, M. R.; MATSUMOTO, S.; CAIN, P; SCOTT, N.S. Repetitive DNA of grapevine: class present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 86, p. 173-80, 1993.
- VERMA S.K.; KHANNA V.; SINGH N. Random amplified polymorphic DNA analysis of Indian scented basmate rice (*Oryza sativa* L.) germoplasma for identification variability and duplicate accessions, if any. *Eletrophorese*. Jun. v. 20, n. 8, p. 1786-9, 1999.
- VIRK, S.P; BRIAN V.F.L.; MICHAEL T.J., NEWBURY, J.H. Use of RAPD for the study of diversity with plant germoplasm collections. *Heredity*, vol. 74, p.170-179, 1994.
- WILLIANS, J. G. K., HANAFEY, M.K., RAFALSKI J.A.TINGEY S.V. Genetic analysis using random amplified polimorphic DNA markers. *Metho. Enz.*, 218, 704 - 40, 1993.
- WILLIANS, J. G. K.; KUBLECLIC; A . R.; LIVAK, K. J.; RAFALKI, J. A; TINGEY, S.V. DNA poloymorphisms amplified gy arbitrary primers are

- useful a genetic marker. *Nucleic Acids Research*, vol. 18, p.6531-6355, 1990.
- XAVIER, R. G. Estudo da ocupação nodular de Rizóbio em genótipos de Caupi (*Vigna unguiculata* L. walp) agrupados pela técnica de RAPD. Seropédica: Departamento de Solos. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, 2000 123p.
- ZENG, Y.; L. I, Z.; YANG, Z.; WANG, X.; SHEN, S.; ZHANG, H. Ecological and genetic diversity of rice germoplasm in Yunnan, China. *Plant Gen. Res. Newsletter*, vol. 125, p. 24-28, 2001.
- YANG, X. and QUEIROZ, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet*, vol. 86, p. 205-212, 1993.