

**Detecção da Divergência  
Genética em Somaclones  
da Cultivar de Arroz IAC 47  
Utilizando Marcadores  
RAPD**





Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1678-9601

Dezembro, 2003

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 7***

## **Deteccão da Divergência Genética em Somaclones da Cultivar de Arroz IAC 47 Utilizando Marcadores RAPD**

Leila Garcês de Araújo  
Anne Sitarama Prabhu  
Marta Cristina Filippi  
Lázaro José Chaves

Santo Antônio de Goiás, GO  
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Arroz e Feijão**

Rodovia Goiânia a Nova Veneza Km 12 Zona Rural

Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 533 2123

Fax: (62) 533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Carlos Agustin Rava*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

*Aloisio Sartorato*

*Josias Correa de Faria*

Supervisor editorial: *Marina A. Souza de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Capa:

Editoração eletrônica: *Sebastião José de Araújo*

**1ª edição**

1ª impressão (2003): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

---

Detecção da divergência genética em somaclones da cultivar de arroz IAC 47 utilizando marcadores RAPD / Leila Garcês de Araújo ... [et al...]. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2003.

23 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 7)

1. Arroz – Brusone. 2. Arroz – Análise Molecular. I. Araújo, Leila Garcês de. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 633.1894 (21. ed.)

---

© Embrapa 2003

# Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>9</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>10</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>14</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>20</b>



# Detecção da Divergência Genética em Somaclones da Cultivar de Arroz IAC 47 Utilizando Marcadores RAPD

---

Leila Garcês de Araújo<sup>1</sup>

Anne Sitarama Prabhu<sup>2</sup>

Marta Cristina Filippi<sup>3</sup>

Lázaro José Chaves<sup>4</sup>

## Resumo

Dezessete somaclones de arroz de terras altas da cultivar IAC 47 com diferentes tipos de planta e reação de resistência ou suscetibilidade à brusone nas folhas foram utilizados para análise de divergência genética com marcadores RAPD. Dois somaclones (SC02 e SC04) foram resistentes a três isolados de *Pyricularia grisea* provenientes de somaclones da cultivar IAC 47 no campo, enquanto a cultivar IAC 47 foi suscetível. O estudo da herança de dois tipos de plantas distintas, um com folhas eretas verde-escuras e outro com folhas decumbentes verde-amarelo, mostrou que um gene dominante controla o tipo de planta. Dos 32 *primers* utilizados, OPA02 e OPD02 amplificaram bandas polimórficas entre somaclones que apresentaram folhas eretas verde-escuras e folhas decumbentes verde-amarelo. O agrupamento mais seguro, exibindo 80% de similaridade foi alcançado com 17 *primers*. A resistência à brusone, para a raça IC-2 de *P. grisea* foi associada ao tipo de planta com folha ereta verde-escura.

Palavras Chaves: Análise molecular, *Oryza sativa*, brusone, variação somaclonal, cultura de tecido.

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, Doutora em Agronomia, Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (UFG), Caixa Postal 131, 74001-970 Goiânia, GO, leilagarces@pop.com.br.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D. em Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO, prabhu@cnpaf.embrapa.br.

<sup>3</sup> Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão. cristina@cnpaf.embrapa.br.

<sup>4</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, UFG.

# Detection of genetic divergence in somaclones of rice cultivar IAC 47 utilizing RAPD markers

---

## Abstract

Seventeen somaclones of upland rice cultivar IAC 47 showing different plant types, and either resistance or susceptibility to leaf blast were utilized for RAPD for genetic divergence analysis. Two somaclones (SC02 and SC04) were resistant to three field isolates of *P. grisea* retrieved from somaclones, while the cultivar IAC 47 was susceptible. The inheritance study of two distinct plant types, one with erect bright green leaves and the other with droopy yellow green leaves, showed that a single, dominant gene govern each plant type. Of 32 random decamer primers utilized, OPA02 and OPD02 amplified polymorphic bands between somaclones showing erect bright green leaves and droopy yellow green leaves. Reliable grouping exhibiting 80% similarity was achieved with 17 primers. Leaf blast resistance to race IC-2 of *P. grisea* was associated with the plant type of erect bright green leaves.

Index terms: Molecular analysis, *Oryza sativa*, tissue culture, somaclonal variation, rice blast.



## Introdução

A cultivar IAC 47 ocupou mais que 60% de 2,5 milhões de hectares em arroz de terras altas no Brasil desde o seu lançamento em 1973, devido a sua adaptação às condições de solos ácidos, tolerância à deficiência hídrica e alto potencial de produtividade. Um dos fatores limitantes de sua produtividade foi o alto grau de suscetibilidade à brusone, causada por *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. Os métodos convencionais de melhoramento genético através de cruzamentos desta cultivar com genótipos doadores de resistência à brusone, normalmente de arroz irrigado resultaram, na maioria dos casos, na introdução de características não desejáveis, como suscetibilidade à mancha-de-grãos.

A importância da indução de variabilidade genética para características agrônomicas, utilizando a cultura de tecidos como ferramenta a partir de cultivares bem adaptadas para condições locais é bem conhecida (Toenniessen, 1990). Foi demonstrada a herdabilidade da variação somaclonal para doenças e outras características agrônomicas (Larkin & Scowcroft, 1981; Fukui, 1983). Os estudos realizados na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás, GO, apresentaram resultados promissores quanto à indução de variabilidade genética para a resistência à brusone, utilizando-se panículas imaturas de cultivares de arroz de terras altas e irrigado (Araújo, 1994). Visando a aumentar a frequência de variantes para resistência às doenças, utilizaram-se, para regeneração, as plantas de  $F_1$  de cruzamentos entre cultivares suscetíveis e doadoras de resistência. Os resultados mostraram aumento da frequência de plantas resistentes à brusone nos somaclones desenvolvidos a partir de plantas  $F_1$  do que nas plantas regeneradas das cultivares suscetíveis (Araújo et al., 1998). Foram desenvolvidos somaclones da cultivar Araguaia com tipo de planta em leque, alto grau de resistência à brusone nas folhas e panículas e alguns com potencial de produtividade superior à cultivar Araguaia. A herança de resistência dos somaclones de Araguaia oriundo da cv. Araguaia para a raça IB-45 de *P. grisea* foi controlada por um par de genes dominantes (Araújo et al., 1999). Estes somaclones poderão ser utilizados como novas fontes de resistência para o melhoramento genético de arroz de terras altas. Em investigações quanto à variação somaclonal para resistência à brusone em progênies R2, R3 e R4 regeneradas de plantas (R1) derivadas de panículas imaturas de IAC 47 Araújo et al. (1997) mostraram que as populações segregaram variando de resistência completa a diferentes graus de suscetibilidade. Como consequência destes resultados, foram realizados estudos detalhados nas gerações avançadas de

somaclones de IAC 47 que apresentaram diferenças quanto ao tipo de planta e resistência à brusone.

Várias técnicas da biologia molecular estão disponíveis para detecção de polimorfismo genético em nível de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Lanaud & Lebot, 1997). Marcadores baseados em PCR como RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) têm sido muito usados para estimar a diversidade genética entre genótipos e, em poucos casos, para análises de plantas derivadas de cultura de tecido. Entretanto, estas alterações foram relatadas entre somaclones de trigo (Brown et al., 1993), cana-de-açúcar (Oropeza et al., 1995; Taylor et al., 1995) *Stylosanthes guianensis* (Cònsoli, 1995), banana (Damasco et al., 1996), beterraba (Munthali et al., 1996), pêssego (Hashimi et al., 1997), cevada (Todoroviska et al., 1997) e coníferas (Fourré et al., 1997). Em arroz, análise de RAPD foi realizada entre somaclones que diferem em caracteres específicos, para estudar o polimorfismo (Moon et al., 1996; Godwin et al., 1997; Banerjee et al., 1998; Moukadiri et al., 1999; Yang et al., 1999).

O presente trabalho relata investigações sobre a heritabilidade de tipo de planta, divergência genética entre somaclones da cultivar de arroz IAC 47 e associação da resistência à brusone nas folhas com tipo de planta.

## Material e Métodos

### Material vegetal e indução de variação somaclonal

Sementes da cultivar IAC 47 obtida de uma planta em casa de vegetação foram semeadas em vasos plásticos contendo 6 kg de solo adubado com 10 g de NPK (4-30-16), 2 g de sulfato de zinco, 4 g de sulfato de amônio e depois desbastadas para três plantas por vaso. Panículas imaturas com 1-4 cm de comprimento, com espiguetas de coloração branca ou levemente amarela, foram usadas para indução de calos e regeneração de plantas de arroz da cv. IAC 47, de acordo com Xie et al. (1990). A nomenclatura proposta por Yurkova et al. (1982) foi utilizada, sendo  $R_1$  regenerantes primários e as gerações subseqüentes,  $R_2$  a  $R_7$ , para a primeira a sexta geração das progênies auto fecundadas. Os procedimentos utilizados para o desenvolvimento de somaclones são apresentados na Figura 1.

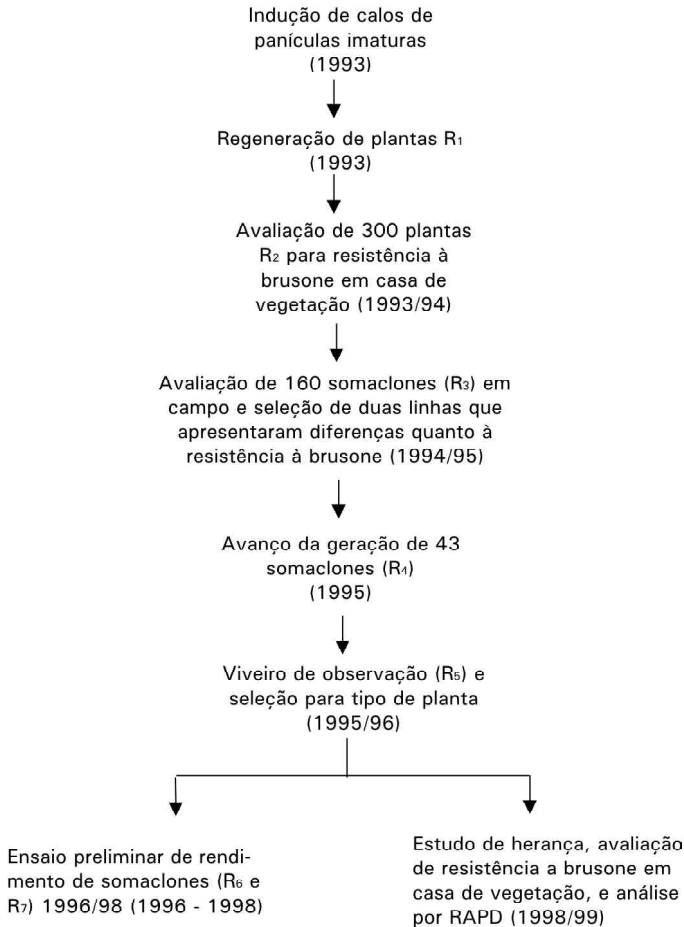


Fig. 1. Procedimentos utilizados para o desenvolvimento de somaclones.

### Estudo de herança para tipo de planta dos somaclones da cv. de arroz IAC 47

Foram realizados cruzamentos entre a cv. IAC 47 caracterizado por plantas com folhas decumbentes e levemente verdes (*pgl*), como genitor feminino, e dois somaclones (SC1 e SC8) como genitores masculinos. Os somaclones SC1 e SC8 caracterizados por tipos de plantas com folhas eretas e verde-escuras (*bgl*) e folhas decumbentes e verde-amarelo (*ygl*), respectivamente. Progênieis ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ) e retrocruzamento ( $RC_1$ ) para parentais suscetíveis foram avaliados em condições

de campo. O solo foi adubado com 250 kg ha<sup>-1</sup> (4-30-10) NPK, 125 kg ha<sup>-1</sup> N na forma de sulfato de amônio e 20 kg ha<sup>-1</sup> de sulfato de zinco. Uma cobertura adicional de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N como sulfato de amônio foi feita no perfilhamento máximo. Foram semeadas as sementes em dez linhas de progênies de F<sub>2</sub>, 20 de RC<sub>1</sub> e 40 de F<sub>3</sub> de cada cruzamento, incluindo uma linha de cada genitor e F<sub>1</sub>. As linhas de 1,0 m comprimento foram espaçadas de 0.35 m entre linhas. Foi realizada avaliação após 60 dias do semeio para identificar plantas dos somaclones SC1 e SC 8 caracterizados por folhas eretas verde-escuras e folhas decumbentes verde-amarelo, respectivamente. A cv. IAC 47 exibiu folhas decumbentes e levemente verdes. Os dados de segregação de número de plantas das populações de F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e RC<sub>1</sub> foram submetidos a análise de  $\chi^2$ .

### **Avaliação de brusone nas folhas em casa de vegetação**

As sementes de 17 somaclones (R<sub>6</sub>) de IAC 47 e do genitor cv. IAC 47 foram semeadas em bandejas plásticas de 30x10x15 cm, contendo 3 kg de solo adubado com 5 g NPK (4-30-16), 1 g sulfato de zinco e 2 g sulfato de amônio no plantio. Uma cobertura adicional com 2 g de sulfato de amônio foi realizada após 20 dias do semeio. Dez sementes de cada somaclone foram semeadas em sulcos de 4,0 cm de comprimento, totalizando 16 sulcos por bandeja.

As inoculações foram realizadas utilizando-se quatro isolados de *P. grisea*, três obtidos de somaclones (SC1, SC2 and SC7) e um da cv. IAC 47. Os patótipos foram previamente identificados, baseando-se na reação de oito diferenciadoras internacionais (Atkins et al., 1967). As plantas foram inoculadas após 22 dias do semeio com uma suspensão de esporos (3x10<sup>5</sup> conídios.ml<sup>-1</sup>), separadamente com cada isolado, utilizando um Devilbiss Nº 15, conectado a um compressor, mantendo pressão uniforme. As plantas inoculadas foram incubadas em câmara úmida por 24 horas e depois transferidas para casa de vegetação sob temperaturas variando de 25 a 29°C. A reação da brusone nas folhas foi avaliada de sete a nove dias após a inoculação utilizando uma escala visual de 0 a 9, modificada por Leung et al. (1988). As reações de 0 a 3 foram consideradas como incompatíveis (planta resistentes), e de 5 a 9, como compatíveis (planta suscetível). Os testes foram repetidos duas ou três vezes e as avaliações consistentes e as notas maiores foram utilizadas.

### **Extração de DNA genômico**

Quando as plantas se encontravam no estágio de quatro folhas, as folhas foram coletadas e conservadas em nitrogênio líquido para extração de DNA

utilizando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Este método consiste em macerar 200 mg de tecido foliar fresco com nitrogênio líquido usando bastão de vidro em microtubos de 1,5 ml e incubação por uma hora a 65°C com 700 µl de tampão de extração (100 mM de Tris-HCl, pH 8; 20 mM de EDTA; 1,4 M de NaCl; 2% de CTAB; 1% de Polivinil e 2% de Mercaptoetanol) pré-aquecido. As proteínas são removidas com um solvente composto por clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção de 24:1. Os ácidos nucleicos foram precipitados em isopropanol frio, lavados com etanol a 70%, secos a vácuo e ressuspensos em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) contendo 10 mg/ml de RNAase. A e incubados a 37°C por 30 minutos para digestão do RNA. A concentração do DNA foi estimada através do fluorômetro e ajustada para 25 ng/µl. O DNA da cultivar de arroz aromático Basmati-370 foi extraído e usado como controle.

As reações de amplificação do DNA foram conduzidas segundo Williams et al. (1990). Cada 25 µl de volume de reação continha: 25 ng de DNA; 2,5 µl de tampão de reação (200 mM Tris - HCl, pH 8.4 e 500 mM de KCl); 0,75 µl de 50 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µl de dNTP (100 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP); 1,0 µl de *primer* [Operon Technologies, Boulevard, CA, USA (0,2 µM)]; uma unidade de *Taq* polimerase e 50 µl de óleo mineral para prevenir a evaporação. Um total de 32 *primers* (Operon Technologies Inc., USA) foram usados para amplificação de fragmentos genômicos de DNA.

A amplificação enzimática foi realizada em termociclador (MJ Research modelo PTC-100-60), programado para 40 ciclos, sendo: 15 segundos a 94°C (desnaturação do DNA); 30 segundos a 36°C (anelamento do *primer* ao DNA molde) e 1 minuto a 72°C (extensão dos *primers*). Depois dos 40 ciclos foi efetuada uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,4% em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM e EDTA 2 mM) contendo 10 mg de brometo de etídio. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, utilizando-se o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

### **Análise estatística**

Os perfis de RAPD foram analisados com base na presença (1) ou ausência (0) de bandas RAPD individuais. Os dados foram analisados usando o programa NTSYS, versão - 1.7/1992. A distância genética foi estimada através do coeficiente de

similaridade de Jaccard. A matriz de distância genética foi utilizada para análise de agrupamento de somaclones, baseando-se no dendrograma construído pelo método não ponderado por médias aritméticas (UPGMA). Os somaclones foram agrupados de acordo com a resistência à brusone e tipo de planta. Para análise de variância molecular, utilizou-se o programa estatístico AMOVAPREP E AMOVA 155, desenvolvido por Excoffier et al. (1992). A AMOVA foi realizada para desdobramento da variação genética total que ocorreu entre e dentro de grupos.

## Resultados e Discussão

### Herança do tipo de planta dos somaclones da cultivar IAC 47

Os somaclones exibiram folhas eretas verde-escuras e folhas decumbentes verde-amarelo e o genitor (IAC 47), do qual os somaclones foram derivados, mostrou folhas decumbentes e levemente verdes. A segregação para tipo de planta das progênies  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $BC_1$  e  $F_3$  do cruzamento de IAC 47 com dois somaclones está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Segregação de progênies  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $BC_1$  e  $F_3$  dos cruzamentos entre a cv. IAC 47 e dois somaclones de SC1 e SC8 para o tipo de planta.

Genitores	Tipo de planta	Geração	Dados observados		Razão esperado*	$\chi^2$	Probabilidade
			<i>bgl</i>	<i>pgl</i>			
SC1 x IAC 47	<i>bgl</i> <sup>1</sup> x <i>pgl</i> <sup>2</sup>	$F_1$	20	0	<i>bgl</i>	-	-
		$F_2$	78	22	3:1	0.48	0.49
		$BC_1$	12	8	1:1	0.80	0.37
		$F_3$	28	12	3:1	0.53	0.46
SC8 x IAC 47	<i>ycl</i> <sup>3</sup> x <i>pgl</i>	$F_1$	20	0	<i>ycl</i>	-	-
		$F_2$	74	26	3:1	0.053	0.82
		$BC_1$	12	8	1:1	0.80	0.37
		$F_3$	27	13	3:1	1.20	0.27
SC8 x SC1	<i>ycl</i> x <i>bgl</i>	$F_1$	20	0	<i>ycl</i>	-	-
		$F_2$	78	22	3:1	0.48	0.49
		$RC_1$	13	7	1:1	1.80	0.18
		$F_3$	26	14	3:1	2.13	0.14

<sup>1</sup>*bgl* = planta com folhas eretas verde-escuras.

<sup>2</sup>*pgl* = plantas com folhas decumbentes e levemente verde da cultivar IAC 47.

<sup>3</sup>*ycl* = plantas com folhas decumbentes verde-amarelo.

A progênie  $F_1$  do cruzamento de IAC 47 com SC 1 mostrou tipo de planta com folhas eretas verde-escuras (*bgl*) e do cruzamento de IAC 47 com SC8 mostrou tipo de planta com folhas decumbentes verde-amarelo (*ycl*), indicando a natureza dominante do gene que controla o tipo de planta característico dos somaclones. A população  $F_2$  do cruzamento IAC 47 x SC1 segregou para três plantas com folhas eretas verde-escuras para uma planta com folhas decumbentes e levemente verde da cultivar IAC 47 (*pyl*). Da mesma maneira, a população  $F_2$  do cruzamento IAC 47 x SC8 segregou na razão mendeliana esperada, sendo três para plantas com folhas decumbentes verde-amarelo e uma do tipo de planta de IAC 47. Estes resultados indicaram que cada tipo de planta é controlado por um gene. A população  $F_2$  do cruzamento SC1 x SC8, segregou na proporção de três plantas com folhas decumbentes verde-amarelo e uma ereta verde-escura, indicando que diferentes alelos do mesmo loco controlam os dois tipos de plantas. Neste caso a relação de dominância é a seguinte: *ycl* > *bgl* > *pyl*. Os resultados do retrocruzamento e famílias  $F_3$  de cada cruzamento confirmaram a natureza monogênica dominante dos tipos de plantas com folhas eretas verde-escura e decumbentes verde-amarelo dos cruzamentos IAC 47 x SC1 e IAC 47 x SC8, respectivamente. Mutações herdáveis para precocidade, albinismo, colmo curto e esterilidade, foram relatadas nas progênies de somaclones de arroz regeneradas a partir de calos (Fukui, 1983). Setenta e dois por cento de plantas de arroz regeneradas de culturas de calos mostraram mutações morfológicas (Oono, 1978). A variação morfológica foi também relatada por Sun et al. (1983). A frequência de alterações em caracteres como altura de planta, fertilidade, e algumas outras características foram cultivar específica nas populações somaclonais (Zhuravlev & Zmeeva, 1996). As mutações gênicas para diferentes caracteres têm sido relatadas freqüentemente em várias culturas, incluindo arroz. No presente estudo, a obtenção de variação nos somaclones para tipo de planta, diferindo da cultivar original IAC 47 e herdável, pode ser resultante de uma possível mutação.

### **Varição somaclonal para brusone**

Os resultados da inoculação dos somaclones com quatro isolados de *P. grisea* estão apresentados na Tabela 2.

Os somaclones apresentaram reações diferenciais para os diferentes isolados testados. Nenhum dos somaclones foram resistentes a todos os isolados. Dos 17 somaclones cinco mostraram reação de resistência (0-3) para a raça IB-1, que foi isolada da cv. IAC 47 e é predominante em cultivares de arroz de terras altas. Os somaclones também apresentaram diferenças na reação para três isolados (Pysc<sub>1</sub>,

**Tabela 2.** Reação de 17 somaclones ( $R_7$ ) e da cv. IAC-47 a quatro isolados de *Pyricularia grisea*, em condições artificiais de inoculação.

Genótipo	Tipo de planta	Isolados			
		<sup>1</sup> Pysc <sub>1</sub> (IC-2)	<sup>1</sup> Pysc <sub>2</sub> (IB-1)	<sup>1</sup> Pysc <sub>7</sub> (IB-1)	<sup>2</sup> Pyiac <sub>47</sub> (IB-1)
SC01 <sup>3</sup>	<i>bgl</i> <sup>4</sup>	3 <sup>5</sup>	0	5	3
SC02	<i>bgl</i>	0	0	3	5
SC03	<i>bgl</i>	3	3	5	5
SC04	<i>bgl</i>	0	1	3	5
SC05	<i>ygl</i>	5	5	7	5
SC06	<i>bgl</i>	3	3	5	7
SC07	<i>ygl</i>	7	7	7	7
SC08	<i>ygl</i>	5	5	5	5
SC09	<i>ygl</i>	5	5	0	0
SC10	<i>ygl</i>	7	5	7	7
SC11	<i>ygl</i>	7	5	5	7
SC12	<i>ygl</i>	7	7	3	5
SC13	<i>ygl</i>	5	5	3	3
SC14	<i>ygl</i>	5	5	5	1
SC15	<i>ygl</i>	7	7	7	5
SC16	<i>ygl</i>	5	5	7	1
SC17	<i>ygl</i>	5	7	7	5
IAC 47	<i>pgl</i>	5	5	7	7

<sup>1</sup>Isolados de campo obtidos de somaclones; a raça internacional está entre parênteses.

<sup>2</sup>Isolados de campo obtidos de IAC 47.

<sup>3</sup>SC = Somaclones.

<sup>4</sup>*bgl* = Planta com folhas eretas – escuras; *pgl* = planta com folhas levemente verde da cultivar IAC 47; *ygl* = planta com folhas decumbentes verde-amarelo.

<sup>5</sup>Reação da brusone nas folhas 0 a 3 = reações incompatíveis (resistente), graus 5 a 9 = reações compatíveis (suscetível).

Pysc<sub>7</sub>, Pyiac<sub>47</sub>). Dois somaclones, SC02 e SC04, foram resistentes a três isolados (Pysc<sub>1</sub>, Pysc<sub>2</sub>, Pysc<sub>7</sub>) coletados dos somaclones (SC1, SC2 e SC7) no campo. A cv. IAC 47, da qual os somaclones foram derivados foi suscetível para todos os isolados. Estes resultados sugerem a indução de variação somaclonal para gene maior de resistência a diferentes raças de brusone nas folhas e podem ser utilizados como fontes de resistência para raças específicas. Em outro estudo a herança da resistência para a raça IB-45 de *P. grisea* dos somaclones de arroz de terras altas da cultivar Araguaia foi governada por um gene dominante (Araújo et al., 1999).

### Análise de RAPD

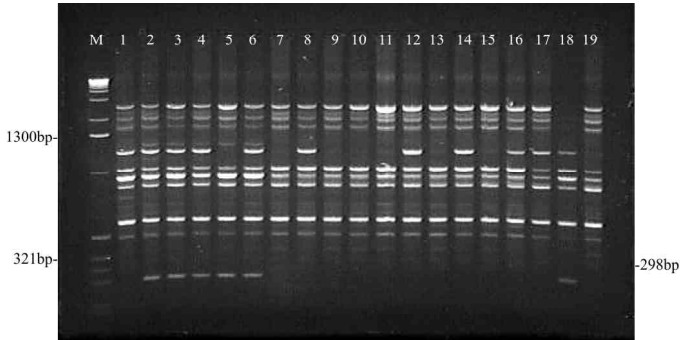
Dos 32 *primers* testados, 15 resultaram em 144 produtos de amplificação que foram monomórficos em todos os somaclones e na cv. IAC 47 (Tabela 3).



**Tabela 3.** Relação dos 32 *primers* (oligonucleotídeos) da Operon Technologies Inc., utilizados como iniciadores, suas respectivas seqüências de bases e os números de bandas monomórficas e polimórficas observadas entre génotipos.

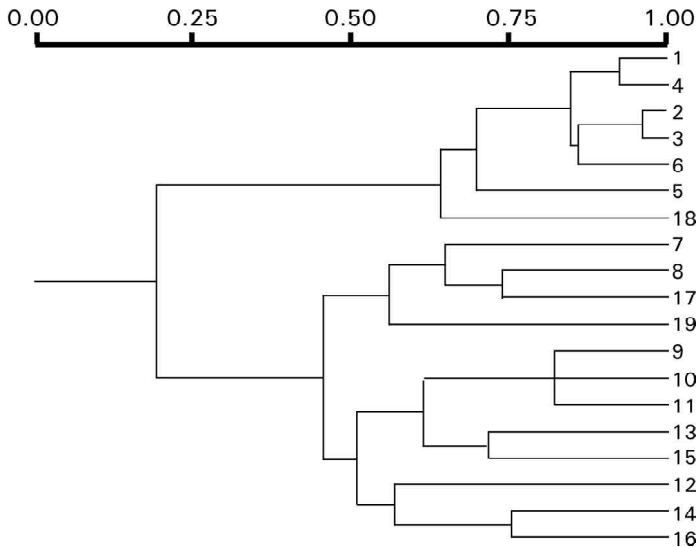
<i>Primer</i>	<i>Seqüência (5'® 3')</i>	<i>Número de bandas monomórficas</i>	<i>Número de bandas polimórficas</i>
OPA01	CAGGCCCTTC	7	2
OPA02	TGCCGAGCTG	3	4
OPA13	AGTCAGCCAC	6	0
OPA17	GACCGCTTGT	3	0
OPA18	AGGTGACCGT	3	4
OPA20	GTTGCGATCC	3	0
OPB07	GGTGACGCAG	4	2
OPC02	GTGAGGCGTC	5	0
OPC06	GAACGGACTC	3	1
OPC13	AAGCCTCGTC	5	1
OPC16	CACACTCCAG	4	0
OPD02	GGACCCAACC	5	1
OPD03	GTCGCCGTCA	7	2
OPD04	TCTGGTGAGG	3	0
OPE14	TGCGGCTGAG	5	3
OPE15	ACGCACAACC	5	1
OPE16	GGTGACTGTG	4	0
OPF06	GGGAATTCGG	6	1
OPF09	CCAAGCTTCC	5	2
OPF10	GGAAGCTTGG	4	3
OPG02	GGCACTGAGG	5	0
OPG06	GTGCCTAACC	6	0
OPG10	AGGGCCGTCT	6	3
OPG12	CAGCTCACGA	5	0
OPK01	CATTTCGAGCC	4	0
OPK04	CCGCCCAAAC	8	0
OPK06	CACCTTTCCC	4	1
OPK07	AGCGAGCAAG	8	0
OPK08	GAACACTGGG	4	1
OPK10	GTGCAACGTG	4	0
OPK12	TGGCCCTCAC	3	2
OPK14	CCCCTACAC	4	0
Total		151	34

Os outros 17 *primers* amplificaram, 34 bandas polimórficas. Os perfis dos marcadores entre os cinco somaclones (SC1, SC2, SC3, SC4, SC6) foram idênticos com OPA02 (Figura 2) e OPD02 e diferenciaram este grupo de todos os outros somaclones. Entretanto, os produtos de amplificação correspondentes ao somaclone SC5 foram ausentes a 1300-pb e presentes a 321-pb.



**Fig. 2.** Análise eletroforética de produtos de amplificação obtida com o *primer* OPA-2. Os perfis: M = Ladder 1 Kb, Gibco BRL; 1-17 = somaclones de arroz da cultivar comercial de arroz IAC 47; 18 = cultivar IAC 47; 19 = Basmati-370 (cultivar utilizada como testemunha aromática). O tamanho dos fragmentos está indicado nos dois lados da figura.

O dendrograma gerado no presente estudo através da análise de agrupamento com base nos dados de RAPD mostrou que o comprimento da bifurcação do eixo horizontal diferenciando os dois grupos correspondeu aos perfis dos marcadores (Figura 3).



**Fig. 3.** Dendrograma gerado a partir da análise de agrupamento construído pelo método UPGMA, baseado de coeficiente de similaridade de Jaccard, mostrando a divergência genética entre os 17 somaclones da cultivar de arroz IAC 47 (1 a 17), cultivar IAC 47 (18) e cultivar aromática Basmati-370 (19).

A análise de agrupamento mostrou 80% de similaridade entre dois grupos de somaclones. O primeiro grupo, que incluiu SC1, SC2, SC3, SC4 e SC6, foi bem definido e apresentou reação de resistência para o isolado Pysc1 (raça IC-2) de *P. grisea* e folhas eretas verde-escuras. O somaclone SC5 e a cultivar IAC 47, que pertencem ao mesmo grupo mostraram reação suscetível à raça IC-2 (Figuras 2, 3 e Tabela 2). Entretanto, a diferença entre o grupo de 12 somaclones suscetíveis com folhas decumbentes verde-amarelo e a cv. IAC 47 está na ausência de uma banda a 298-pb, embora ela pertença ao mesmo grupo indeterminado. O somaclone SC5, mesmo com sua suscetibilidade à brusone e tipo de planta com folhas decumbentes verde-amarelo (*yg1*) foi agrupado no primeiro grupo. Não foi possível identificar pequenas alterações genéticas que ocorreram durante a regeneração de plantas como a característica de grão aromático de somaclones através da análise de RAPD com 32 *primers*. As diferenças entre somaclones aromáticos, cv. aromática Basmati 370 e cv. não aromática IAC 47 não foram evidenciadas e possivelmente requerem o uso de outros *primers*. A análise de variância molecular mostrou diferenças estatísticas entre os grupos de somaclones ( $f_{st} = 0.589^{**}$ ) e a variação entre grupos foi maior do que dentro de grupos. Este valor indica que estes dois grupos são diferentes. Se a resistência à brusone fosse independente do marcador RAPD, o valor de  $\phi_{st}$  esperado seria "0".

Vários genes marcadores que afetam caracteres morfológicos como coloração de parte das plantas, reação a doenças e pragas têm sido identificados como variações pré-existentes ou induzidas através de mutagênicos (Khush & Kinoshita, 1991). Os marcadores morfológicos que afetam colmos e folhas são mais fáceis de serem identificados, enquanto os genes para resistência à brusone podem ser identificados somente através de testes de patogenicidade em condições controladas. A herança de muitos desses genes tem sido determinada e catalogada em 12 grupos de ligação. Os genes para folha verde-escura (*bgl*) e folha verde-amarelo (*yg1*) pertencem aos grupos de ligação 3 e 10, respectivamente (Khush & Kinoshita, 1991). A cv. IAC 47, possuindo folha levemente verde e somaclones exibindo folha verde-amarelo pertencem ao mesmo grupo de ligação 10. Os resultados obtidos na presente análise com marcadores moleculares RAPD também mostraram que a cultivar original e os somaclones com folhas verde-amarelo pertencem ao mesmo grupo (Figura 2). A análise por RAPD de 29 linhas  $R_2$  da cv. de arroz Hwaseongbyeon mostrou que o número de linhas exibindo polimorfismo de DNA, comparado com a cultivar original, variou de 0 a 10 dependendo do *primer* usado (Moon et al., 1996).

A detecção de marcadores RAPD ligados a características específicas, como resistência a doenças, tem sido demonstrada em várias culturas. Tohme et al. (1993) utilizaram 200 *primers* em bulks de DNA de plantas resistentes e suscetíveis aos isolados de *P. grisea* para identificar dois marcadores que segregaram com a resistência na linhagem Cica 9-31-4 derivada da cv. IRAT 13. No presente estudo, os dois grupos de somaclones com diferentes tipos de plantas foram relacionados à variação fenotípica para reação à raça específica de *P. grisea*, IC-2 (isolado Pysc<sub>1</sub>).

## Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, L. G. **Varição somaclonal em arroz, com relação à resistência à brusone**. 1994. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; FILLIPI M. C. Inheritance of resistance to leaf blast in somaclones of rice cultivar Araguaia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 182-184, jun. 1999.
- ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; FREIRE, A. B. Varição somaclonal na cultivar de arroz IAC-47 para resistência parcial à brusone. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 125-130, jun. 1997.
- ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S.; FREIRE, A. B. Variation for rice blast resistance in early somaclonal generations derived from immature panicles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 8, p. 1349-1359, ago. 1998.
- ATKINS, J. G.; ROBERT, A. L.; ADAIR, C. R.; GOTO, K.; KOZAKA, T.; YANAGIDA, R.; YAMADA, M.; MATSUMOTO, S. An international set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 3, p. 297-301, Mar. 1967.
- BANERJEE, H.; CHIMOTE, V.; RAINA, S. K. DNA polymorphism among rice somaclones. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 40, n. 4, p. 543-553, 1998.

BROWN, P. T. H.; LANGE, K. G.; KRANZ, E.; LORZ, H. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 237, n. 3, p. 311-317, Mar. 1993.

CÔNSOLI, L. **Análise genética e molecular da variação somaclonal em *Stylosanthes guianensis* (aubl.) Sw. (Leguminosae)**. 1995. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

DAMASCO, O. P.; GRAHAM, G. C.; HENRY, R. J.; ADKINS, S. W.; SMITH, M. K.; GODWIN, I. D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 1/2, p. 118-123, Nov. 1996.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetics**, Maryland, v. 131, n. p. 479-491, 1992.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1995. 220 p.

FOURRÉ, I. L.; BERGER, P.; NIQUET, L.; ANDRÉ, P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, n. 2, p. 159-169, Feb. 1997.

FUKUI, K. Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 65, n. 3, p. 225-230, 1983.

GODWIN, I. D.; SANGDUEN, N.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; PIPERIDIS, G.; ADKINS, S. W. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. indica) somaclonal progenies. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 5, p. 320-324, Feb. 1997.

HASHIMI, G.; HUETTEL, R.; MEYER, R.; KRUSBERG, L.; HAMMERSCHLAG, F. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus culture of peach. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 9, p. 624-627, June 1997.

KHUSH, G. S.; KINOSHITA, T. Rice karyotype, markers genes, and linkage groups. In: KHUSH, G. S.; TOENNIESSEN, G. H. (Ed.). **Rice biotechnology**. Wallingford: CAB International: IRRI, 1991. p. 83-108.

LANAUD, C.; LEBOT, V. Molecular techniques for increased use of genetic resources. In: AYAD, W. G.; HODGKIN, T.; JARADAT, A.; RAO, V. R. (Ed.). **Molecular genetic techniques for plant genetic resources**. Rome: IPGRI, 1997. p. 92-97.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures of plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, n. 4, p 197-214, Oct. 1981.

LEUNG, H.; BORROMEO, E. S.; BERNARDO, M. A.; NOTTEGHEM, J. L. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 1227-1233, Sept. 1988.

MOON, H. P.; KANG, K. H.; CHOI, S. H.; AHN, S. N. Genetic variation of a single pollen-derived doubled haploid population in rice. In: KHUSH, G. S. **Rice genetics III**. Los Baños: IRRI, 1996. p. 492-498.

MOUKADIRI, O.; LOPES, C. R.; CORNEJO, M. J. Physiological and genomic variations in rice cells recovered from direct immersion and storage in liquid nitrogen. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 3, p. 442-449, Mar. 1999.

MUNTHALI, M. T.; NEWBURY, H. J.; FORD-LLOYD, B. V. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 7, p. 474-478, 1996.

OONO, K. **Test tube breeding of rice by tissue culture**. Ibaraki: Tropical Agriculture Research Center, 1978. p. 109-124. (Tropical Agriculture Research Series, 11).

OROPEZA, M.; GUEVARA, P.; GARCIA, E.; RAMÍREZ, J. L. Identification of somaclonal variants of sugarcane (*Saccharum* spp.) resistant to sugarcane mosaic virus via RAPD markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 13, n. 2, p. 182-191, June 1995.

SUN, Z. X.; ZHAO, C. Z.; ZHENG, K. L.; QI, X. F.; FU, Y. P. Somaclonal genetics of rice *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 67, n. 1, p. 67-73, 1983.

TAYLOR, P. W. J.; GEIJSKES, J. R.; KO, H. L.; FRASER, T. A.; HENRY, R. J.; BIRCH, R. G. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 7/8, p. 1169-1173, June 1995.

TODOROVISKA, E.; TRIFONOVA, A.; PETROVA, M.; VITONOVA, Z.; MARINOVA, E. Agronomic performance and molecular assessment of tissue culture derived barley lines. **Plant Breeding**, Berlin, v. 116, n. 6, p. 511-517, Dec. 1997.

TOENNIESSEN, G. H. Rice biotechnology: progress and prospects. In: GRAYSON, B. T.; GREEN, M. B.; COPPING, L. G. (Ed.). **Pest management in rice**. London: Elsevier, 1990. p. 514-536.

TOHME, J.; MONTENEGRO, M. V.; CORREA, F.; MARTINEZ, C.; ZEIGLER, R.; ROCA, W. Implications of molecular markers in breeding for Colombian lineages of rice blast. In: ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL PROGRAM ON RICE BIOTECHNOLOGY, 6., 1991, Chaing Mai, Thailand. **Abstracts...** New York: Rockefeller Foundation, 1993.

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**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

XIE, Q. J.; RUSH, M. C.; CAO, J. Somaclonal variation for a disease resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In: GRAYSON, B. T.; GREEN, M. B.; COPPING, L. G. (Ed.). **Pest management in rice**. London: Elsevier, 1990. p. 491-509.

YANG, H.; Tabei, Y.; KAMADA, H.; KAYANO, T.; TAKAIWA, F. Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 6, p. 520-526, Feb. 1999.

YURKOVA, G. N.; LEVENKO, B. A.; NOVOZHJLOV, P. V. Plant regeneration in wheat tissue culture. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, Jena, v. 177, n. 4/5, p. 337-344, 1982.

ZHURAVLEV, Y. N.; ZMEEVA, V. N. Gameto and somaclonal variations in rice cultivars of Russian far East. In: KHUSH, G. S. (Ed.). **Rice genetics III**. Los Baños: IRRI, 1996. p. 505-510.