

FLUXO GÊNICO ENTRE ARROZ VERMELHO E ARROZ CULTIVADO ESTIMADO POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES¹

Tuliana Oliveira Brunes², Paulo Hideo Nakano Rangel², Rosana Pereira Vianello Brondani²,
Francisco Moura Neto², Péricles de Carvalho Ferreira Neves², Claudio Brondani²

ABSTRACT

GENE FLOW BETWEEN RED RICE AND CULTIVATED RICE ESTIMATED BY MICROSATELLITE MARKERS

The study aimed to evaluate the capacity of SSR markers to detect the gene flow between the red rice (RR) and the cultivated rice (CR). SSR is currently used in plant genomic analysis due to the high information content, to be co-dominant, and based on the PCR reaction. The field experiment was organized in ten concentric circles, 5 m to 50 m apart from a central red rice plant, assumed as the pollen donor. One hundred twenty rice CR plants, cv. BR-Irga 409, were planted in the intersections of the concentric circles and the twelve radii. From 51 SSR markers, four were selected due to their capacity to detect the polymorphism between RR and CR, aiming to identify RR alleles in seeds produced by BR-Irga 409 plants. The maximum distance found for gene flow between RR and CR plants was 10 m from the RR plant. In theory, at 0.1% cross pollination rate, this distance can generate 4,710 hybrids between RR and CR. In the next generation, about 3,532 plants would produce exclusively rice grains with red color. The SSR markers were able to identify the gene flow between RR and CR; therefore, they can be useful to increase the precision of cross pollination rate estimates in rice, mainly if used with other methodologies (e.g., herbicide tolerant plants).

KEY WORDS: cross pollination, microsatellite markers, *Oryza sativa*.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o mais importante cereal para o consumo humano, fazendo parte da dieta alimentar de mais da metade da população mundial. O gênero *Oryza* possui, além dos cultígens *O. sativa*, cultivado no mundo todo, e *O. glaberrima*, cultivado na África, dezenove espécies silvestres. Sete dessas espécies possuem o genoma AA e podem produzir

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a capacidade de marcadores SSR em detectar a ocorrência de fluxo gênico entre o arroz vermelho (AV) e o arroz cultivado (AC). Marcadores SSR são utilizados em análise genômica de plantas devido ao alto conteúdo informativo, serem co-dominantes e baseados na reação de PCR. O ensaio de campo foi realizado em dez círculos concêntricos de 5 m a 50 m de distância, a partir de uma planta AV central, que foi a fonte doadora de pólen. Foram semeadas 120 plantas de arroz da cultivar BR-Irga 409, distribuídas nas interseções entre os círculos e doze raios. A partir de 51 marcadores SSR, foram selecionados quatro marcadores que detectaram polimorfismo entre o AV e AC, para identificar os alelos de AV em sementes produzidas pelas plantas da cultivar BR-Irga 409. A distância máxima encontrada entre a planta AV doadora de pólen e uma planta AC que produziu sementes híbridas (AV x AC) foi de 10 m. Teoricamente, sob 0,1% de taxa de cruzamento, esta distância de polinização pode dar origem a 4.710 sementes híbridas entre AC e AV, o que, na geração seguinte, resultará em 3.532 plantas produzindo grãos vermelhos. Marcadores SSR foram capazes de identificar fluxo gênico entre AR e AC; e, portanto, podem ser empregados em associação com outras metodologias (ex. plantas tolerantes a herbicidas) para melhorar a precisão das estimativas de polinização cruzada em arroz.

PALAVRAS-CHAVE: polinização cruzada, marcadores microsatélites, *Oryza sativa*.

híbridos férteis com o arroz cultivado. Dentre estas, a espécie *O. glumaepatula* ocorre no Brasil (Brondani *et al.*, 2002).

O arroz é espécie de hábito reprodutivo preferencialmente autógamo, com uma taxa de fecundação cruzada, em geral, inferior a 1% (Roberts *et al.* 1961). Isso, contudo, não elimina a possibilidade de ocorrer fecundação cruzada, por exemplo, entre o arroz cultivado e o arroz vermelho (*O. sativa* L.), a principal

1. Trabalho recebido em jul./2005 e aceito para publicação em maio/2007 (registro nº 649).

2. Embrapa Arroz e Feijão. Caixa Postal 179, CEP 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO. E-mails: tulianabrunes@yahoo.com.br; phrangel@cnpaf.embrapa.br; brondani@cnpaf.embrapa.br; rosanavb@cnpaf.embrapa.br; pericles@cnpaf.embrapa.br

erva daninha da rizicultura irrigada. Tal denominação é devido à coloração do pericarpo de sua semente.

O arroz vermelho é considerado a principal erva daninha da cultura do arroz irrigado, pela sua alta capacidade de infestação nas lavouras, o que ocasiona a depreciação do produto devido à mistura dos grãos vermelhos com os grãos comerciais. Assim, a possibilidade de cruzamento entre suas plantas e o arroz cultivado é indesejável, principalmente, em campos de produção de sementes. Normalmente, esse arroz exibe traços morfológicos e fisiológicos relacionados ao seu potencial como erva daninha, tais como a grande plasticidade fenotípica, maturação precoce, facilidade de dispersão de sementes e longo período de dormência da semente (seis a sete anos) (Messeguer *et al.* 2004).

Como os genes do arroz vermelho podem ser facilmente transferíveis para o arroz cultivado, em pouco tempo pode-se obter indivíduos com o tipo de planta e de grão comercial, porém, com coloração vermelha dos grãos. Assim, estudos sobre a distância máxima de migração do grão de pólen, e o conseqüente fluxo gênico, são fundamentais para ajudar no planejamento de melhores alternativas de controle do arroz vermelho. Por extensão, estudos que envolvem a identificação de fluxo gênico entre diferentes genótipos de arroz plantados em áreas adjacentes, incluindo cultivares geneticamente modificadas e espécies silvestres de arroz, são importantes para avaliar o risco potencial de transferência indesejável de genes entre esses genótipos.

Os estudos de estimativa de fluxo gênico em arroz normalmente envolvem a utilização de variedades geneticamente modificadas (transgênicas), contendo um gene de tolerância a herbicida. Estas variedades atuam como fonte doadora de pólen, e as sementes das plantas receptoras (não transgênicas), oriundas de hibridação entre a planta doadora e receptora do pólen, serão também tolerantes ao herbicida. Utilizando esta metodologia, diversos trabalhos estimaram a distância máxima em que se detectaram fluxo gênico em arroz (Messeguer *et al.* 2001, 2004, Ramírez *et al.* 2002). Contudo, não foram encontrados resultados conclusivos sobre a distância máxima de fluxo gênico, o que pode variar com a variedade, coincidência de florescimento e condições ambientais, como a intensidade e direção dos ventos, e regime de chuvas na floração.

O emprego de outras metodologias pode aumentar a precisão das estimativas de distância

máxima de ocorrência de fluxo gênico. Stewart *et al.* (2003) sugerem a utilização de marcadores moleculares como auxílio a estudos de fluxo gênico, por serem neutros (seu padrão de polimorfismo independe do ambiente) e de número ilimitado. Dentre os marcadores moleculares, destacam-se os microssatélites (Weber & May 1989) ou SSR (*simple sequence repeats*).

Esse tipo de marcador é amplamente utilizado em análise genômica pelo seu alto conteúdo informativo, por serem co-dominantes e baseados na reação de PCR (*polymerase chain reaction*). No caso do arroz, SSR ganha interesse especial, pois já se têm disponíveis mais de 2.000 marcadores (McCouch *et al.* 2002). Por serem altamente informativos, os marcadores microssatélites permitem detectar polimorfismo molecular com grande eficácia. Por exemplo, estudos de diversidade alélica têm documentado mais de 25 alelos por loco entre diferentes acessos de arroz cultivado (McCouch *et al.* 1997). Olufowote *et al.* (1997) discriminaram 71 linhagens de arroz geneticamente relacionadas, com apenas seis marcadores SSR. Song *et al.* (2003) utilizaram dois marcadores moleculares microssatélites para estimar a distância máxima de fluxo gênico entre o arroz cultivado e a espécie silvestre *O. rufipogon*, encontrando fluxo a uma distância de 3,6 m.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de marcadores microssatélites em detectar a ocorrência de fluxo gênico entre o arroz vermelho e o arroz cultivado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no campo experimental da Embrapa Arroz e Feijão, município de Alegrete-RS (29°46'59" S, 55°47'31" W e 102 m), em área isolada, sem a presença de lavoura comercial ou infestação com arroz vermelho. O ensaio foi instalado em delineamento concêntrico, sendo que no centro do experimento foi transplantada uma planta de arroz vermelho (acesso Gen009) com dez panículas. Isso garantiu a quantidade suficiente de pólen para manter a homogeneidade do padrão molecular do estudo. Foram transplantadas 120 plantas da cultivar BR-Irga 409, distribuídas nas interseções entre dez círculos concêntricos (distanciados 5,0 m entre si) e doze raios distanciados em

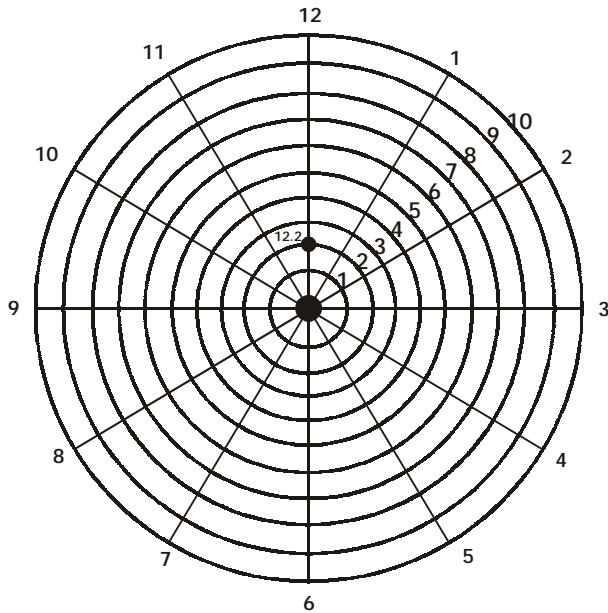


Figura 1. Croquis do experimento de identificação de fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado (no centro, a planta de arroz vermelho; nos pontos de intersecção entre os raios (1 a 12) e os círculos (1 a 10) estão as plantas de arroz cultivado, cv. BR-Irga 409. Em destaque, a localização da planta 12.2, na qual foram detectadas sementes híbridas, resultantes de fluxo gênico.

30° (Figura 1), o que definiu também a forma de identificação das plantas no experimento (exemplo: planta 12.1, ilustrada na figura). A cultivar BR-Irga 409 foi escolhida por apresentar coincidência de florescimento com o acesso Gen009 de arroz vermelho.

De cada uma das 120 plantas da cultivar BR-Irga 409, foram colocadas para germinar vinte sementes. Das vinte plântulas obtidas, foram constituídos cinco grupos (*bulks*) de quatro plantas, para a extração de DNA. A extração de DNA foi feita pelo método de Doyle & Doyle (1987), sendo posteriormente quantificado e diluído.

As reações de PCR, para a análise de marcadores SSR, foram conduzidas em volume final de 15 μL , contendo: 3,55 μL de H₂O estéril; 1,5 μL de tampão 10x; 1,3 μL de dNTP 2,5 mM; 1,3 μL de DMSO 50% (dimetil-sulfoxido); 2,15 μL de primer (0,9 μM); 0,2 μL de enzima Taq polimerase (5 unidades. μL^{-1}); e 5 μL de DNA (3ng. μL^{-1}). As reações foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando o seguinte perfil de temperaturas: um ciclo inicial de 94°C por cinco minutos; 29 ciclos de 94°C por um minuto; 56°C, por um minuto; 72°C, por um minuto; e uma extensão final de 72°C por sete minutos. Foram avaliados 51 marcadores microssatélites para detectar polimorfismo entre o arroz vermelho Gen009 e a cultivar BR-Irga 409. Os fragmentos amplificados via reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 6%, corada com nitrato de prata, de acordo com protocolo descrito em Creste *et al.* (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem dos 51 marcadores SSR permitiu a seleção de quatro deles, 4653, 4661, 4797 e 5132, por terem detectado polimorfismo entre o arroz vermelho Gen009 e a cultivar BR-Irga 409 (Tabela 1). Os quatro marcadores foram utilizados para a análise dos cinco *bulks* de plântulas de cada uma das 120 plantas BR-Irga 409, distribuídas na área experimental (Figura 1). Os cinco *bulks* foram constituídos para isolar o DNA conjuntamente, e, com isso, acelerar o processo de identificação de alelos procedentes do arroz vermelho. Cada *bulk* foi constituído por quatro plantas porque, acima deste número, há perda da detecção de alelos que ocorrem em frequência inferior a 1:8; isto é, alelos ocorrendo em heterozigose, no conjunto de oito alelos possíveis em quatro plantas heterozigotas de arroz (Borba *et al.* 2005). Para detectar a presença de fluxo gênico utilizando

Tabela 1. Descrição dos marcadores SSR utilizados na identificação de sementes híbridas de oriundas do fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado (P.B.: tamanho em pares de base; T.A.: temperatura de anelamento; Crom.: localização cromossômica).

Primer	Sequência Forward (3' - 5')	Sequência Reverse (3' - 5')	P.B.	T.A. (°C)	Crom.
4653	CTCGGACAAGCATGATCT	AACCGATGCAGATCAGAG	155	56	12
4661	CCTATTAGTGTGCCAGTTGC	CCTCATTACCAGATGCCAAC	171	56	9
4797	GGAGAAGGCAATGCAACACG	GCCATTGCCGCAAGTACTA	119	56	4
5132	CGCCATCTCTTTCAGTTCC	GGAGAGGACGAGGAGAAGAA	172	56	10

marcadores SSR, os *bulks* de plântulas devem apresentar o loco SSR em heterozigose, ou seja, conter um alelo materno de BR-Irga 409 e um alelo paterno (oriundo do grão de pólen) do arroz vermelho.

De todos os seiscentos *bulks*, o alelo do arroz vermelho somente foi detectado nas sementes da planta 12.2, isto é, posicionada a 10 m do centro (arroz vermelho), no raio 12, círculo 2 (Figuras 1 e 2). O DNA de cada uma das quatro plântulas dos cinco *bulks* foi isolado separadamente, e estas foram novamente analisadas com o marcador 4797, a fim de averiguar quantas plântulas dentro de cada *bulk* foram resultantes do evento de polinização cruzada com o arroz vermelho.

Das vinte plântulas avaliadas nos *bulks* derivados planta BR-Irga 409 número 12.2, onze delas apresentaram o alelo correspondente à planta de arroz vermelho, ou seja, foram resultantes do processo de polinização cruzada devido ao fluxo gênico. As nove restantes foram, portanto, resultado de autofecundação na própria cultivar (Figura 3). Das onze plântulas híbridas detectadas pelo marcador 4797 (Figura 3), quatro não apresentaram o alelo proveniente de BR-Irga 409. Logo, houve a ocorrência de alelo nulo, que pode ser resultante de mutação no sítio de anelamento de *primers* SSR, ocasionando a falta de amplificação e, por conseguinte, a perda do produto de PCR. Como a maioria dos marcadores SSR origina-se de regiões não codantes de DNA, uma mutação nesta região é evolutivamente neutra, sendo preservada nos indivíduos (Yazdani *et al.* 2003). Como o alelo utilizado para a estimativa de fluxo gênico é o oriundo da planta de arroz vermelho, a ausência do alelo da

planta receptora do grão de pólen não inviabiliza a análise. Por outro lado, caso o alelo nulo fosse proveniente da planta doadora do grão de pólen, haveria uma subestimação da ocorrência de fluxo gênico. Este caso ocorreu para os marcadores 4653, 4661 e 5132, ou seja, os alelos do arroz vermelho não foram detectados nos *bulks* da planta 12.2 para estes marcadores. A ocorrência de alelos nulos em locos microssatélites tem sido identificada em espécies como o trigo (Saito *et al.* 2004), o arroz (Brondani *et al.* 2002) e, também, em humanos (Han *et al.* 2001).

Ramírez *et al.* (2002) utilizaram plantas com tolerância a herbicida para detectar o fluxo de genes entre duas cultivares de arroz, e estimaram que a polinização cruzada pudesse ocorrer a no máximo 3 m de distância. Por outro lado, Messeguer *et al.* (2001), também utilizando plantas com o gene de tolerância a herbicida, indicaram uma distância máxima de 10 m para ocorrer a polinização cruzada entre cultivares de arroz. As causas da disparidade nesses resultados, provavelmente, foram as diferenças varietais e ambientais nos dois experimentos. Na presente pesquisa, a estratégia de *bulks* permitiu que fosse avaliada uma amostra de vinte plântulas provenientes de cada planta cultivada. Esta amostra, que em arroz pode representar 4% dos grãos produzidos por planta, pode ter sido a causa da não identificação do fluxo gênico em distância inferior a 10 m pelo marcador 4797. Por outro lado, a análise de SSR em todas as sementes produzidas pelas 120 plantas do arroz BR-Irga 409, mesmo utilizando a estratégia de *bulks*, alcançaria custos proibitivos.

De acordo com Messeguer *et al.* (2004), a utilização de plantas polinizadoras contendo um gene

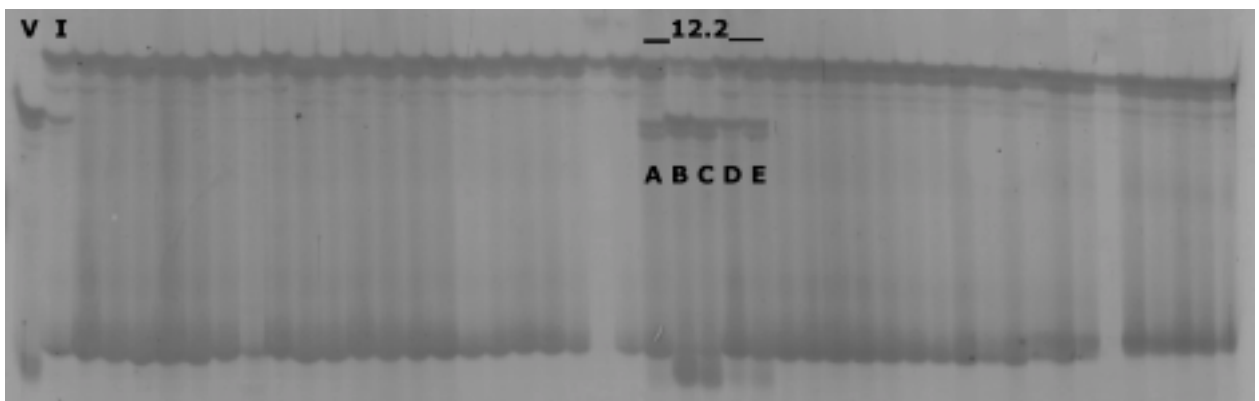


Figura 2. Caracterização dos bulks de plântulas de arroz cultivado BR-Irga 409, 12.2 (A, B, C, D, E), com o marcador SSR 4797 (V: arroz vermelho Gen009, planta doadora de grão de pólen; I: BR-Irga 409, planta receptora de grão de pólen).

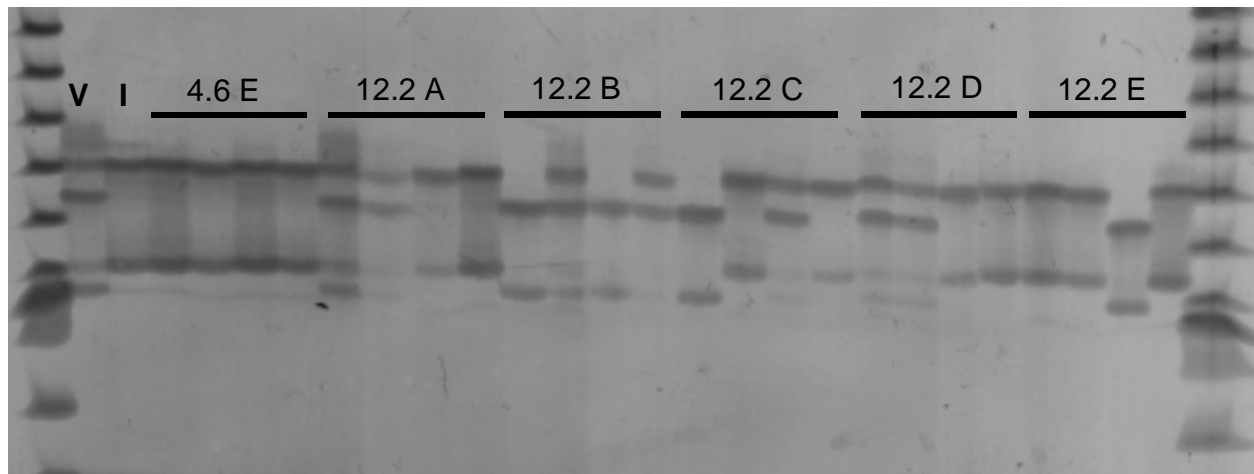


Figura 3. Análise do marcador SSR 4797 em plântulas componentes de cada bulk (V: arroz vermelho; I: BR-Irga 409; bulk 4.6; E: controle negativo para o fluxo gênico; bulks 12.2 A até 12.2 E: plântulas com e sem a ocorrência de fluxo gênico; n: identificação de plântulas com alelo nulo).

de tolerância a herbicida, em experimentos para estimar o fluxo gênico, tem a vantagem de permitir que toda a produção de sementes das plantas receptoras possa ser avaliada. Contudo, as plântulas derivadas da fecundação cruzada, ou seja, possuidoras do gene de resistência, estariam em estado hemizigótico (apenas um alelo do gene de resistência ao herbicida), tendo menor capacidade de suportar doses elevadas do herbicida, aplicado para identificar justamente as plântulas oriundas da fecundação cruzada (Messeguer *et al.* 2004). Neste caso, plantas hemizigotas podem não apresentar tolerância ao herbicida aplicado, e serem avaliadas como sementes originadas de auto-fecundação, resultando em subestimativas da ocorrência de fecundação cruzada. Outra limitação do uso dessa metodologia é que os estudos de fluxo gênico estariam restritos a fontes polinizadoras transgênicas para o gene de tolerância a herbicida ou outro gene marcador disponível; ou seja, não haveria flexibilidade para a escolha de genótipos de arroz para avaliar a capacidade de dispersão polínica.

Ambas metodologias para determinação de estimativas de fluxo gênico em arroz (tolerância a herbicidas ou marcadores moleculares) possuem limitações técnicas. Contudo, quando utilizadas conjuntamente, podem oferecer uma medida mais precisa da estimativa de fluxo gênico. Esta poderia ser alcançada através da aplicação do herbicida com menor concentração do princípio ativo, e as plantas resistentes (plantas falso-positivas, homozigotas da

planta receptora, e as heterozigotas para o gene de resistência) poderiam ser precisamente distinguidas pelo uso de marcadores moleculares microsatélites.

O fluxo gênico a 10 m de distância entre o arroz vermelho e o arroz cultivado, detectado neste trabalho, ajuda a explicar o alto potencial de contaminação desta invasora em áreas de cultivo comercial. Considerando essa distância entre a fonte polinizadora e a receptora, encontram-se, em média, 94.200 plantas (área de 314 m², com a densidade de 300 plantas m⁻²), 471.000 panículas ou, ainda, 47 milhões de sementes, aproximadamente. À uma taxa conservadora de 0,1% de fecundação cruzada, tem-se a possibilidade de serem obtidas 4.710 sementes híbridas entre o arroz vermelho e o arroz cultivado, a partir de uma só planta de arroz vermelho. Na geração seguinte, essas sementes híbridas darão origem a cerca de 3.532 plantas (75%), que produzirão grãos de coloração vermelha. A presença de grãos vermelhos deprecia a classificação comercial do grão, diminuindo o preço pago ao produtor após o beneficiamento. Ademais, se ocorrer esta polinização cruzada em um campo de produção de semente genética, o problema irá se manifestar em plantas que darão origem à semente básica. Como, neste caso, não se admite plantas com grão de coloração vermelha, o campo de produção seria reprovado para a comercialização de semente básica (Brasil 2006).

A utilização da metodologia aqui preconizada, aliada a estratégias que possam avaliar a totalidade de sementes produzidas no experimento, como o uso

de plantas tolerantes a herbicida, como fontes doadoras de pólen, pode aumentar a precisão da determinação do fluxo gênico em arroz. Assim, tais metodologias podem ser empregadas conjuntamente também para estimar o fluxo gênico em cultivares de arroz geneticamente modificadas e em acessos de *Oryza glumaepatula*, espécie silvestre autóctone do Brasil.

CONCLUSÕES

1. A distância encontrada de 10 m para migração do grão de pólen do arroz vermelho para o arroz cultivado ajuda a explicar o alto potencial de contaminação dessa invasora em áreas de cultivo comercial e de produção de sementes de arroz.
2. Os marcadores SSR podem ser utilizados como ferramenta para a detecção de fluxo gênico em arroz, e, se empregados em associação com outras metodologias (ex. plantas tolerantes a herbicidas), permitem melhorar a precisão das estimativas de polinização cruzada.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao trabalho, e à Embrapa Arroz e Feijão, pela concessão da bolsa de iniciação científica à T.O.B.

REFERÊNCIAS

- Borba, T.C.O., R.P.V. Brondani, P.H.N. Rangel & C. Brondani. 2005. Evaluation of number and informativity of fluorescent SSR markers for rice germplasm characterization. *Crop Breeding Applied Biotechnology*, 5: 157-165.
- Brasil. Ministério da Agricultura. 2006. Instrução Normativa Número 25, Padrão para produção e comercialização de sementes de arroz. Disponível em: http://www.abrasem.com.br/legislacao_sac/01_producao_e_comercio/031_16-12-2005_estabelecidos_os_padroes_nacionais_de_sement.htm. Acesso em: 31 maio 2007.
- Brondani, C., P.H.N. Rangel, R.P.V. Brondani & M.E. Ferreira. 2002. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*O. sativa*) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1192-1203.
- Creste, S., A. Tulmann Neto & A. Figueira. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Han, G.R., E.S. Song & J.J. Hwang. 2001. Non-amplification of an allele of the D8S1179 locus due to a point mutation. *International Journal of Legal Medicine*, 115: 45-47.
- McCouch, S.R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho, N. Huang, T. Ishii & M. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*, 35: 89-99.
- McCouch S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerk, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware & L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 9: 199-207.
- Messeguer, J., C. Fogher, E. Guiderdoni, V. Marfà, M.M. Català, G. Baldi & E. Melé. 2001. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1151-1159.
- Messeguer, J., V. Marfà, M.M. Català, E. Guiderdoni & E. Melé. 2004. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. *Molecular Breeding*, 13: 103-112.
- 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.). *Genome*, 40: 370-378.
- Ramírez, H., V.G. Menezes, & S.T. Peske. 2002. Estimativa do fluxo gênico através da polinização cruzada em cultura do arroz irrigado. p. 266-8. In Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz da Embrapa, 7. Santo Antônio de Goiás, Goiás. 691 p. Anais.
- Roberts, E.H., R.Q. Crawford & F. Cochet. 1961. Estimation of percentage of natural crosspollination: experiment on rice. *Nature*, 190:1084-1085.
- Saito, M., M. Konda, P. Vrinten, K. Nakamura & T. Nakamura. 2004. Molecular comparison of waxy null alleles in common wheat and identification of a unique null allele. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1205-1211.
- Song, Z., P.B. Lu, Y.G. Zhu & J.K. Chen. 2003. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. *New Phytologist*, 157: 657-665.

- Stewart, C.N., M.D. Halfhill & S.I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics*, 4: 806-817.
- Weber, J.L. & P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396.
- Yazdani, R., I. Scotti, G. Jansson, C. Plomion & G. Mathur. 2003. Inheritance and diversity of simple sequence repeats (SSR) microsatellite markers in various families of *Picea abies*. *Hereditas*, 138: 219-227.