

# CONSTRUÇÃO DE MAPA GENÉTICO E ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS DE *Oryza glumaepatula* X *Oryza sativa* UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES <sup>1</sup>

Priscila Nascimento Rangel <sup>2</sup>, Rosana Pereira Vianelo Brondani <sup>3</sup>, Claudio Brondani <sup>3</sup>, Paulo Hideo Nakano Rangel <sup>3</sup>

**Palavras-chave:** Cruzamento interespecífico, mapa de ligação, análise de QTLs

## INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente vinte espécies silvestres de arroz, dentre as quais encontra-se a *Oryza glumaepatula*, uma espécie autógama, de origem Americana e que compartilha o genoma diplóide AA com as espécies cultivadas de arroz (*Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*) (Buso et al., 1998). *O. glumaepatula* apresenta grande potencial como fonte de genes de interesse para o melhoramento do arroz, pois é adaptada às regiões Amazônica, Pantanal e Cerrado, possuindo diferentes tipos de clima e solo. Entretanto, cruzamentos interespecíficos podem incorporar alelos indesejáveis da espécie silvestre para a cultivada, aumentar o espaço de tempo necessário para a recuperação das características favoráveis da variedade elite, e ocasionar a perda de alelos positivos para outras características de importância (Brondani et al., 2001). A realização de introgressão assistida por marcadores permite que estes cruzamentos sejam monitorados, minimizando a ocorrência destes problemas. Para isso, a construção de mapa de ligação baseada em marcadores moleculares é de grande importância, pois além de permitir que este monitoramento seja realizado, possibilita que locos relacionados a características de interesse agrônômico (QTLs – Quantitative Trait Loci) sejam identificados, fornecendo a base para a realização de seleção assistida por marcadores (MAS – Marker Assisted Selection) (Lorieux et al., 2000). Este trabalho objetivou: 1) desenvolver um mapa genético baseado em marcadores SSR para o cruzamento interespecífico *Oryza sativa* (Cica 8) x *Oryza glumaepatula* (RS-16); 2) avaliar a conservação da ligação e ordem dos locos SSR entre dois mapas interespecíficos, os quais possuem o parental RS-16 em comum; 3) genotipar 118 famílias na geração RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> obtida a partir do cruzamento interespecífico entre *Oryza sativa* (Cica 8) e *Oryza glumaepatula* (RS-16).

---

<sup>1</sup> Pesquisa em desenvolvimento com suporte financeiro do CNPq

<sup>2</sup> Bolsista do CNPq, Embrapa Arroz e Feijão. E-mail: [rangelpriscila@hotmail.com](mailto:rangelpriscila@hotmail.com)

<sup>3</sup> Pesquisadores da Embrapa Arroz e Feijão. E-mail: [rosanavb@cnpaf.embrapa.br](mailto:rosanavb@cnpaf.embrapa.br) ; [brondani@cnpaf.embrapa.br](mailto:brondani@cnpaf.embrapa.br) ; [phrangel@cnpaf.embrapa.br](mailto:phrangel@cnpaf.embrapa.br)

## MATERIAL E MÉTODOS

### População experimental

Para obtenção da população experimental, o acesso RS-16 (*Oryza glumaepatula*) foi cruzado com a variedade Cica-8 (*Oryza sativa*). Plantas F<sub>1</sub> foram retrocruzados em direção da variedade Cica-8, e as 186 plantas segregantes RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> obtidas, foram genotipadas para a construção do mapa de ligação. Estas plantas foram mantidas em vasos em casa de vegetação e novamente retrocruzadas para o Cica-8, obtendo-se 870 plantas RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>. Sementes destas plantas foram semeadas em vasos, sendo selecionadas as 114 plantas que apresentaram um maior índice de fertilidade de espiguetas. O DNA destas plantas foi utilizado para a genotipagem para a análise de QTLs. Assim, 114 plantas RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> foram utilizados na análise de QTLs e levados para campo experimental onde serão submetidas a análise fenotípica.

### Coleta do material foliar e extração do DNA genômico

Folhas tenras dos genitores (RS-16 e Cica-8) e de todas as plantas utilizadas no estudo foram colhidas e mantidas a -20°C. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando tampão de extração com detergente catiônico CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) e aproximadamente 150mg de tecido vegetal (Brondani et al., 1998).

### Triagem dos Locos Microsatélites

Os marcadores SSR utilizados para a construção do mapa de ligação foram escolhidos com base em estudo de mapeamento previamente realizado no cruzamento interespecífico entre *O. glumaepatula* (RS-16) e *O. sativa* (BG 90-2), de onde foram selecionados 34 marcadores pertencentes à série OG (Brondani et al., 2001), 14 pertencentes à série OS (Akagi et al., 1996) e 60 pertencentes à série RM (Chen et al., 1997). Foram também utilizados 28 marcadores baseados em seqüências repetidas de trinucleotídeos desenvolvidos a partir de seqüências do genoma do arroz disponibilizadas pela Monsanto (<http://www.monsanto.com>) utilizando o programa Primer 0.5 (Lincoln et al. 1991). Para a análise molecular em RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> foram utilizados 118 marcadores SSR escolhidos com base na suas distribuições ao longo dos 12 grupos de ligação do mapa em RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>.

### Análise genética com Marcadores Microsatélites

As reações de amplificação foram conduzidas em placas de 96 poços em Termociclador PT-100 Thermal Controler (MJ Research). Os locos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 5% corado com brometo de etídio ou em gel de acrilamida 4% corado com nitrato de prata quando maior resolução era necessária para detectar alelos com menor diferença de tamanho em pares de base.

### Análise de segregação e ligação

Os dados de segregação foram submetidos à análise de mapeamento utilizando o software Mapmaker versão 2.0 (Lander et al., 1987) para Macintosh. Os parâmetros utilizados foram

*LOD score* 5 e fração máxima de recombinação ( $\theta$ ) 0,25. Foi utilizada a função de mapeamento Kosambi para calcular as distâncias dos marcadores no mapa em centimorgans (cM). Para cada marcador foi empregado o teste estatístico do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com a finalidade de verificar a significância dos desvios da segregação 1:1 esperada para os locos SSR genotipados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

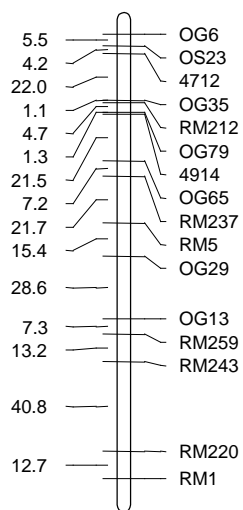
Inicialmente o mapa ligação para o RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> foi construído utilizando os marcadores das séries OG, RM e OS onde, dos 99 marcadores analisados, 92 foram mapeados e distribuídos ao longo de 11 grupos de ligação do arroz. Posteriormente, com o objetivo de aumentar a saturação nos cromossomos 4, 5, 6, 7, 10, 11 e 12, 69 marcadores baseados em seqüências repetidas de trinucleotídeos foram selecionados. Destes, 41 foram descartados, sendo 21 por não terem amplificado à temperatura mínima de 48°C e 20 por não serem polimórficos entre os parentais. Os 28 marcadores restantes foram incluídos na análise de ligação. Assim, o mapa de ligação (Figura 1) foi construído com 136 marcadores microssatélites distribuídos ao longo dos 12 cromossomos de arroz, com uma distância média entre locos SSR de 10 cM. Dos 136 marcadores utilizados, 72 foram visualizados em géis de agarose e 64 em géis de acrilamida. O comprimento total do mapa foi de 1539,1 cM, que é similar ao comprimento de vários mapas já publicados para arroz (1500,4 cM, Brondani et al., 2001; 1822 cM, Temnykh et al., 2000; 1900 cM, Chen et al., 1997).

Na análise comparativa dos mapas desenvolvidos para o RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> dos cruzamentos interespecífico *O. glumaepatula* (RS 16) X *O. sativa* (BG-92) (Brondani et al., 2001) e *O. glumaepatula* X *O. sativa* (Cica-8), os critérios de mapeamento foram definidos a fim de estabelecer a melhor ordem dos marcadores ao longo dos grupos de ligação. Um alto grau de homologia (95%), em termos de conservação da ligação e ordenamento dos marcadores entre os mapas, foi encontrado. Entretanto, dos 101 marcadores mapeados e comuns aos mapas, dois apresentaram inversão em dois grupos de ligação (grupos 2 e 10) e, cinco blocos possuindo de dois a três marcadores, tiveram seu posicionamento alterado dentro dos grupos de ligação 1 e 9. A ocorrência dessas alterações na conservação da ordem provavelmente são resultantes da diferença de amostragem das meioses utilizadas nas estimativas das frequências de recombinação. No primeiro mapa construído (Brondani et al., 2001) foram utilizados 93 indivíduos segregantes, enquanto que no trabalho atual foram utilizados o dobro, 186 indivíduos. A estimativa da ordem dos marcadores depende da ocorrência de duplos recombinantes. Sendo assim, quanto maior o número de indivíduos amostrados, maior a probabilidade de recuperar os eventos de dupla-recombinação para estimativas da ordem (Brondani, 1997). Adicionalmente, a introdução de um maior número de marcadores (baseados em seqüências de trinucleotídeos), que não haviam sido utilizados na construção do mapa anterior, permitiu que novos rearranjos entre marcadores

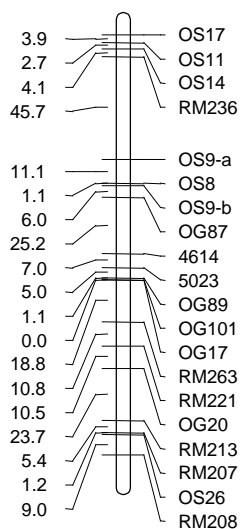
adjacente ocorressem, favorecendo novos ordenamentos dentro dos grupos de ligação. Na análise de segregação dos marcadores avaliados em RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, a proporção 1:1 é esperada. Um teste de  $\chi^2$  para desvios destas proporções esperadas revelou uma distorção nas taxas de segregação para alguns locos SSR. Dos 136 locos genotipados, 25 (18%) apresentaram desvios da segregação esperada (1:1) ao nível de significância de 5%. Neste estudo foram utilizados 186 indivíduos do RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> para análise de ligação, o que descarta a possibilidade de efeito de amostragem para explicar as distorções da segregação esperada. Provavelmente, por se tratar de um cruzamento interespecífico, as distorções observadas resultaram de um processo seletivo durante a esporogênese, gametogênese, redução de fertilidade neste tipo de cruzamento, abortamento de zigotos ou a existência de alelos que ao se expressarem a nível de embrião ou plântula, determinariam a seleção contra determinados genótipos (Brondani et al., 2001; Brondani, 1997). Marcadores SSR com desvios de segregação em arroz não têm sido eliminados da análise de ligação por não acarretarem efeito algum nas estimativas de recombinação dos locos adjacentes (Lorieux et al., 2000). As estimativas de recombinação entre os locos SSR em RC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, a genotipagem de 114 plantas RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> e a mensuração dos dados fenotípicos nas 114 famílias RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, serão utilizadas para a análise de QTLs. As características de interesse agrônomico a serem avaliadas são relacionadas à produtividade, onde os dados fenotípicos de produção, número de panículas e número de perfilhos no cultivo principal e na soca estão sendo tomados, finalizando em março de 2003. O mapeamento de QTLs utilizará as análises de Single Point, Interval Mapping e Composite Interval Mapping.

## CONCLUSÕES

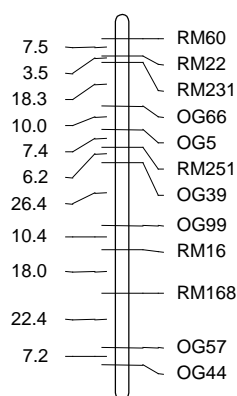
- 1) A construção de mapas genéticos e, conseqüentemente, a identificação de regiões genômicas que controlam características de interesse agrônomico representam um grande avanço nos programas de melhoramento genético de arroz por possibilitarem que seja realizada, com sucesso, a seleção assistida por marcadores.
- 2) A construção de mapas genéticos representando os 12 cromossomos de arroz com base em cruzamentos interespecíficos nos indica ser plenamente possível a utilização deste tipo de cruzamento para a introgressão de genes de interesse em espécies cultivadas e a conseqüente ampliação da sua base genética.
- 3) O elevado nível de conservação da ordem dos marcadores entre os mapas abre novas perspectivas rumo ao desenvolvimento de uma mapa único para o cruzamento interespecíficos *O. glumaepatula* X *O. sativa*. Um mapa referência baseado em marcadores co-dominantes multialélicos possibilitará a busca direcionada com maior eficiência de novos alelos aos QTLs entre cruzamentos envolvendo genótipos não mapeados com grande potencial para serem utilizados no programa de melhoramento genético de arroz



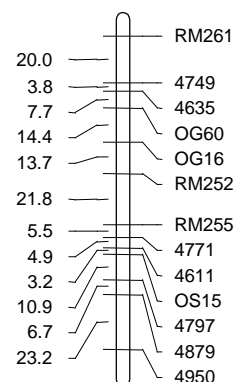
Cromossomo 1



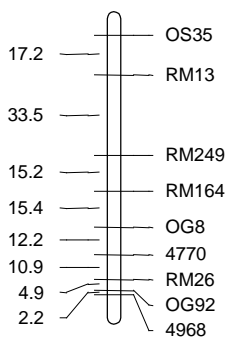
Cromossomo 2



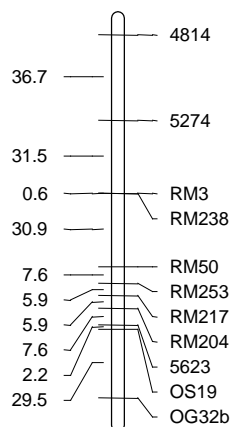
Cromossomo 3



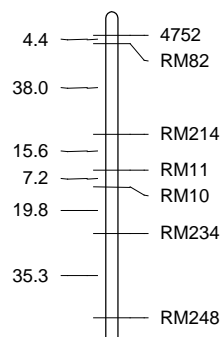
Cromossomo 4



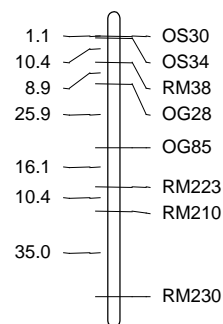
Cromossomo 5



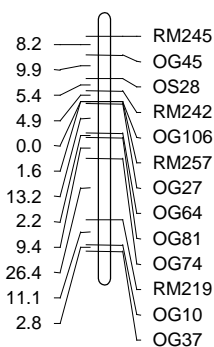
Cromossomo 6



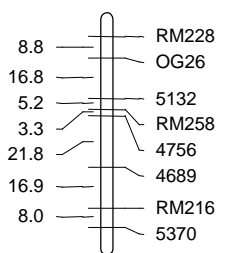
Cromossomo 7



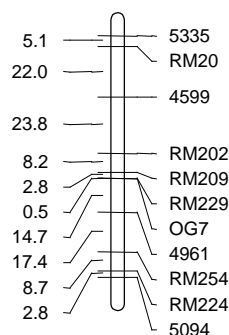
Cromossomo 8



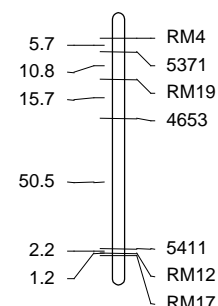
Cromossomo 9



Cromossomo 10



Cromossomo 11



Cromossomo 12

Figura 1. Grupos de ligação obtidos em retrocruzamento *Oryza glumaepatula* (RS-16) X *Oryza sativa* (Cica -8).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. **Microsatellite DNA markers for rice chromosomes**. Theoretical and Applied Genetics 93, 1071-1077. 1996.

BRONDANI, R. P. V. Mapeamento genético comparativo em *Eucalyptus urophylla* utilizando marcadores RAPD. **Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)**. Universidade de Brasília. Brasília. 1997.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. **Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla***. Theoretical and Applied Genetics 97:816-827. 1998.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. **Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* X *Oryza sativa***. Hereditas. 134, 59-71. 2001.

BUSO, G. S. C.; RANGEL, P. H.; FERREIRA, M. E. **Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers**. Molecular Ecology. 7, 107-117. 1998.

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; MCCOUCH, S. R.. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 95, 553-567. 1997.

LANDER E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, M. J.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L.. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics, 1, 174-181. 1987.

LINCOLN S.E., DALY M.J., LANDER E.S. "Primer" software, available from E. Lander, Whitehead Institute, Cambridge, MA. 1991.

LORIEUX, M.; NDJIONDJOP, N.; GHESQUIÉRE, A. **A first interspecific *Oryza sativa* X *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map**. Theor. Appl. Genet. 100, 593-601. 2000.

TEMNYKH, S.; PARK, W. D.; AYRES, N.; CARTINHO, S.; HAUCK, N.; LIPOVICH, L.; CHO, Y. G.; ISHII, T.; MCCOUCH, S. R. **Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.)**. Theoretical and Applied Genetics 100, 697-712. 2000.