

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE INTROGRESSÃO DO CRUZAMENTO INTERESPECÍFICO *ORYZA SATIVA* x *O. GLUMAEPATULA* POR MARCADORES SSR FLUORESCENTES.

**Melo**<sup>1</sup>, Arthur Tavares Oliveira.; **Brondani**<sup>2</sup>, Rosana Pereira Vianello; **Rangel**<sup>3</sup>, Priscila Nascimento; **Rangel**<sup>4</sup>, Paulo Hideo Nakano; **Brondani**<sup>5</sup>, Claudio.

Palavras chave: Cruzamento Interespecífico; Marcadores Moleculares; Introgressão Gênica

### 6. INTRODUÇÃO

A grande maioria das espécies cultivadas possuem limitada variabilidade genética, decorrente principalmente da utilização de germoplasma muito aparentado como genitores nos programas de melhoramento, resultando no estreitamento da base genética das populações para obtenção de novas cultivares e, conseqüentemente, diminuindo os ganhos genéticos com a seleção. O nível de diversidade genética varia muito de espécie para espécie, quanto menor a variabilidade genética, menor os ganhos genéticos com a seleção (FALCONER, 1987). Por isso, um dos objetivos dos programas de melhoramento modernos de arroz tem sido a recuperação da diversidade perdida através da busca por alelos favoráveis em parentes silvestres.

O método de retrocruzamento avançado associado à análise de QTL (AB-QTL Advanced Backcross QTL analysis) é uma ferramenta poderosa para a exploração e uso de espécies silvestres em programas de melhoramento, pois permite o monitoramento da introgressão dos alelos e a seleção, utilizando marcadores moleculares, daqueles genótipos que possuem as regiões de interesse (BRONDANI et al., 2002). Ao final, após algumas gerações de autofecundação, as linhagens de introgressão são obtidas e podem ser testadas e caracterizadas para uso nos programas de melhoramento.

---

<sup>1</sup> Estudante de Graduação da UFG de Biologia. Embrapa Arroz e Feijão, Sto. Antônio de Goiás, GO. tavares@cnpaf.embrapa.br

<sup>2</sup> Pesquisador Doutora em Biologia Molecular. Embrapa Arroz e Feijão, Sto. Antônio de Goiás, GO. rosanavb@cnpaf.embrapa.br

<sup>3</sup> Estudante de Doutorado na UFG em Biologia Molecular. Embrapa Arroz e Feijão, Sto. Antônio de Goiás, GO. priscila@cnpaf.embrapa.br

<sup>4</sup> Pesquisador Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas. Embrapa Arroz e Feijão, Sto. Antônio de Goiás, GO.

<sup>5</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biologia Molecular. Embrapa Arroz e Feijão, Sto. Antônio de Goiás, GO. cbrondani@embrapa.br

Os programas de melhoramento de arroz que objetivam aumentar os ganhos genéticos para características de interesse tem a necessidade de ampliar a variabilidade genética de genitores elite. Uma das alternativas é a utilização de linhagens de Introgressão, derivadas de cruzamentos interespecíficos, como fonte de novos alelos. Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular de 114 linhagens de Introgressão RC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> derivadas do cruzamento *O. sativa* Cica-8 x *O. glumaepatula* RS-16.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento das linhagens seguiu o método de AB-QTL. Um total de 114 plantas RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> provenientes do cruzamento interespecífico *O. sativa* (cultivar Cica-8) X *O. glumaepatula* (acesso RS-16) foram avançadas até a geração RC<sub>2</sub>F<sub>9</sub> pelo método de “single seed descent” (SSD), onde apenas uma semente de cada planta é semeada após cada geração de autofecundação (Figura 1).



Figura 1: 114 linhagens do cruzamento interespecífico *O. sativa* X *O. glumaepatula* sendo preparadas para transplântio após germinação de sementes individuais em casa de vegetação.

Folhas frescas de cada planta foram coletadas para extração de DNA de acordo com o protocolo de extração de Ferreira e Grattapaglia (1998) o qual usa o detergente catiônico CTAB.

Para a caracterização molecular 89 marcadores SSR marcados com as fluorescências hexacloro-6-carboxifluoresceína (HEX) e 6-carboxifluoresceína (FAM)

foram testados para a detecção de polimorfismo entre os parentais Cica-8 e RS-16. Os marcadores polimórficos foram organizados em 18 multiplexes contendo de 4 a 6 marcadores de acordo com a cor da sua fluorescência e o tamanho dos alelos detectados para os parentais. Estes marcadores foram selecionados baseando-se na distribuição destes nos 12 cromossomos do arroz de acordo com o mapa genético do cruzamento *Oryza sativa* X *Oryza glumaepatula* (BRONDANI et al., 2001; RANGEL et al., 2005).

Reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram feitas e amplificadas em condições de pré-ciclo de 5 minutos a 94°C; extensão de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto; 1 minuto de anelamento na temperatura específica de cada primer e 72°C por 1 minuto. A extensão final que foi usada a 72°C por 7 minutos. Estas ampliações teve um volume final de reação de 15 µl contendo 5 µl de DNA a 3,0ng/µl; 2,15 de cada primer; 1,3 µl de dNTP; 1,3 de DMSO; 0,2 µl da enzima Taq Polimerase; 0,15 µl de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e 1,5 µl Tp10x, completando o volume com H<sub>2</sub>O. Eletroforeses foram conduzidas no analisador automatizado do DNA de ABI 3100 (Applied Biosystems) e a genotipagem dos alelos foram executadas usando o software GeneMapper 2.5 (Applied Biosystems). O Finder do software CSSL (versão 0.8 do Finder de CSSL) foi usado estimar a proporção genotípica dos pais em cada linha e construir os gráficos genotípicos.

## RESULTADOS

Dos 89 marcadores SSR testados para verificação de polimorfismo entre os parentais, 69 (77,5%) foram polimórficos. Estes marcadores foram organizados em 18 multiplexes contendo no mínimo 4 marcadores cada, de acordo com a cor da sua fluorescência e tamanho dos alelos detectados, com o objetivo de otimizar o tempo e o custo da análise. Até o momento a caracterização foi feita com 46 marcadores SSR (66%) distribuídos nos 12 cromossomos do arroz. Uma análise preliminar foi feita utilizando o programa CSSL Finder e a distribuição dos fragmentos silvestres introgrididos de *O. glumaepatula* no background genético de *O. sativa* pode ser observada, conforme mostra a Figura 2.

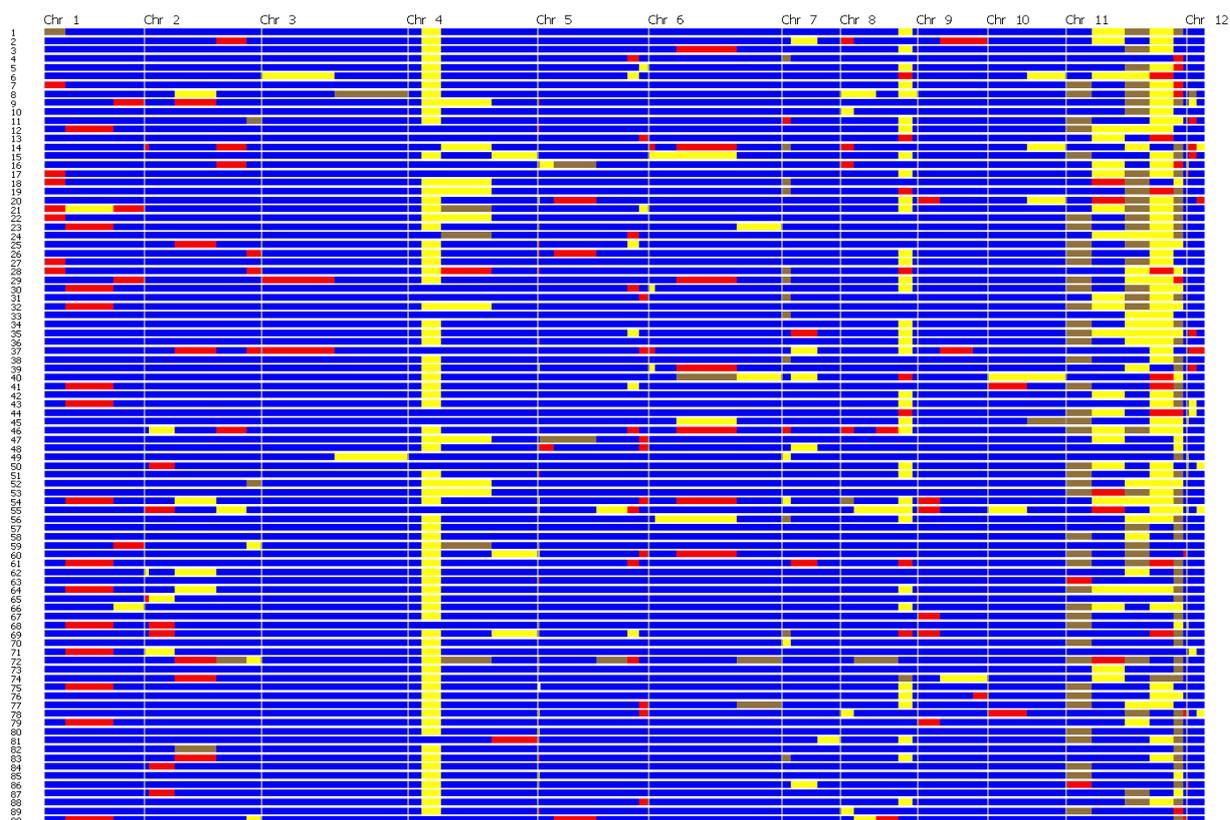


Figura 2: Genótipos gráficos representando os fragmentos silvestres introgridos nas 114 linhagens. Legenda: cor amarela representa o genoma incorporado de *O. glumaepatula*; cor azul representa o genoma do parental recorrente *O. sativa*; cor vermelha representa fragmentos heterozigotos; cor cinza representa fragmentos não detectados devido a dados faltantes.

A caracterização molecular detectou um total de 235 fragmentos de *O. glumaepatula* em todas as 90 linhagens, com uma média de 2,61 por cromossomo. A proporção média de fragmentos introgridos em homozigose foi de 6,04%, variando de 1,72% a 18,97%, e a proporção média de fragmentos em heterozigose foi de 3,24%, variando de zero a 18,97%.

Todas as linhagens apresentaram fragmentos introgridos em pelo menos um dos cromossomos do arroz. Como o número total de marcadores polimórficos ainda não foi utilizado, alguns cromossomos ainda apresetam-se pouco saturados, como os cromossomos 11 e 12, que ainda apresentam apenas 3 marcadores cada. Uma melhor amostragem do genoma será conseguida quando os 23 marcadores polimórficos restantes forem adicionados à análise. Outros 18 marcadores SSR associados a QTLs relacionados a produção também serão utilizados na caracterização das 114 linhagens. Além disso, essas linhagens serão avaliadas em campo experimental na safra 2007/2008 em três locais, o que permitirá a realização de uma associação direta entre a localização e proporção dos fragmentos silvestres introgridos e o desempenho fenotípico das

linhagens. As informações obtidas após a caracterização genotípica e fenotípica das linhagens serão úteis ao programa de melhoramento de arroz.

## CONCLUSÃO

A caracterização molecular das 114 linhagens fornecerá informações úteis ao programa de melhoramento de arroz, facilitando a busca por regiões associadas a características de interesse agrônomo e a seleção das linhagens a serem utilizadas como genitoras no desenvolvimento de novas cultivares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**. n. 134, p.59-71, 2001.
- BRONDANI, C.; BRONDANI R.P.V.; RANGEL P.H.N.; FERREIRA M.E. QTL mapping and introgression of yield related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.** n. 104, p.1192-1203, 2002.
- CSSL Finder version 08 Available at <http://www.mapdistofreefr/CSSLFinderhtm>
- FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV, 279p, 1987.
- RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, C.; RANGEL, P.N.; BRONDANI, R.P.V.; ZIMMERMANN, F.J.P. Development of rice lines with gene introgression from the wild *Oryza glumaepatula* by the AB-QTL methodology. **CBAB**. n.5, p.10-21, 2005.