

CONSTRUÇÃO DE MAPA DE LIGAÇÃO PARA O CRUZAMENTO INTERESPECÍFICO *Oryza glumaepatula* (GEN1233) X *Oryza sativa* (cv. Curinga) COM BASE EM MARCADORES MICROSSATÉLITES E IN-DEL.

RANGEL, Priscila Nascimento¹; **BRONDANI**, Rosana Pereira Vianello²; **RANGEL**, Paulo Hideo Nakano³; **BRONDANI**, Claudio⁴.

1. Introdução

Um mapa genético corresponde a um modelo do arranjo linear de um grupo de locos marcadores ao longo dos cromossomos. Ele indica a posição e as distâncias relativas desses marcadores derivadas das frequências de recombinação calculadas a partir dos dados moleculares obtidos em uma população segregante (RC, F2, RIL). Mapas genéticos têm sido uma ferramenta útil em programas de melhoramento de plantas pois permitem a identificação de regiões cromossômicas associadas a características de interesse (QTL – Quantitative Trait Loci) (Collard et al., 2005). Marcadores moleculares têm sido muito utilizados para estudos dessa natureza, pois permitem acessar a variabilidade diretamente ao nível de DNA. Marcadores microssatélites são vantajosos porque são multialélicos, co-dominantes e estão amplamente distribuídos no genoma. Atualmente, com a disponibilidade da sequência do genoma do arroz, novas classes de marcadores estão sendo desenvolvidas. Marcadores baseados na presença e ausência (in-del) de determinadas regiões genômicas possibilitam a amostragem de regiões de sequências únicas, além de também apresentarem padrão co-dominante, o que os torna adequados para análises de segregação.

O arroz cultivado (*Oryza sativa*) é o principal alimento da dieta de mais da metade da população mundial, sobretudo em países da Ásia, África e da América Latina, onde se encontram dois terços das pessoas subnutridas do mundo. Os sistemas de cultivo predominantes na maior parte dessas regiões é irrigado, sendo que na Ásia, por exemplo, o arroz consome aproximadamente 50% da água de irrigação (Tuong & Bouman, 2003). Com o risco da escassez de água, sistemas de cultivo em lâminas d'água ou irrigados podem sofrer limitações, exigindo o uso de cultivares tolerantes à seca. Essas cultivares devem ser capazes de manter os níveis de produtividade constantes quando os níveis de água no solo estiverem críticos (Liu et al., 2004).

Espécies silvestres de arroz são um importante reservatório gênico e podem ser fonte de alelos de tolerância à seca. A introgressão desses alelos no background genético de uma cultivar elite pode ser monitorada através da construção de um mapa genético e mapeamento de QTLs em uma população segregante proveniente do cruzamento entre essa cultivar e um acesso da espécie silvestre. Isso abre a perspectiva para a detecção de alelos silvestres relacionados à tolerância à seca e à própria elucidação dos mecanismos envolvidos nesse processo.

¹ Aluna de doutorado Biologia/UFG. pn.rangel@gmail.com

² Orientadora. Pesquisadora Embrapa Arroz e Feijão.

³ Pesquisador Embrapa Arroz e Feijão.

⁴ Pesquisador Embrapa Arroz e Feijão.

O objetivo deste trabalho foi construir um mapa genético para uma população segregante RC1F1 proveniente do cruzamento interespecífico entre um acesso da espécie silvestre brasileira *Oryza glumaepatula* (GEN1233) e a cultivar Curinga (*Oryza sativa*) usando marcadores moleculares microssatélites e marcadores baseados em polimorfismo de in-del. Este mapa será usado para mapeamento de QTLs relacionados a tolerância à seca na população RC2F2 proveniente deste cruzamento interespecífico.

2. Metodologia

A cultivar Curinga (*O. sativa*) foi cruzada com o acesso de arroz silvestre GEN1233 (*O. glumaepatula*) para a obtenção de plantas F1. A Curinga é uma cultivar de terras altas e foi escolhida para esse cruzamento porque apresenta ampla adaptação aos mais variados ambientes de cultivo no Brasil, tipo de grão longo-fino a grande resistência à seca (Morais et al., 2005). O acesso GEN1233 foi coletado em região de várzea no Cerrado Goiano. Todas as plantas F1 viáveis foram retrocruzadas com o parental Curinga e 59 plantas RC1F1 foram obtidas.

Os marcadores microssatélites utilizados para a construção do mapa foram selecionados a partir de um mapa de referência denominado "Ciat SSR 2006" disponível no website Gramene (www.gramene.org). Este mapa referência é bastante saturado e apresenta vários pontos âncora separados uns dos outros por distâncias não maiores que 20cM. Cada ponto âncora possui três marcadores espaçados por distâncias menores que 1cM. Entre os marcadores do mapa referência, 258 foram testados para verificação de polimorfismo entre os parentais. Além disso, outro teste foi feito com mais 63 marcadores microssatélites disponíveis para arroz (www.gramene.org) selecionados para saturar regiões que haviam sido sub-representadas pelos marcadores do mapa referência para este cruzamento interespecífico.

Um total de 529 marcadores baseados em polimorfismo de presença ou ausência (in-del) de regiões específicas do genoma do arroz também foram testados. Estes marcadores foram desenvolvidos com base na presença ou ausência de pequenos transposons (300pb) denominados MITEs (Miniature Inverted Transposable Elements) através da busca e comparação de sequências do genoma do arroz (Susan McCouch, comunicação pessoal).

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 15µl contendo 0,3µM de cada primer, uma unidade da enzima Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTP, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, DMSO e 15ng de DNA genômico. Os produtos de amplificação gerados pelos marcadores microssatélites foram visualizados em gel de agarose 5% corado com brometo de etídeo ou em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. Os produtos gerados pelos marcadores baseados em polimorfismo de in-del foram visualizados em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídeo. Os dados de segregação foram usados para a construção do mapa genético utilizando o software MapDisto versão 1.7, usando como parâmetros LOD 3.0 e frequência máxima de recombinação 0.3.

3. Resultados e discussão

Entre os 258 marcadores do mapa referência que foram testados para a verificação de polimorfismo entre os parentais, 27 (10,46%) não apresentaram produto de

amplificação na temperatura mínima de 48°C, 25 (9,69%) não amplificaram o alelo do parental silvestre GEN1233 e 39 (15,12%) não apresentaram polimorfismo entre os parentais do cruzamento. Dos 63 marcadores microssatélites selecionados a partir de bancos de dados públicos do arroz, 14 (22,22%) não amplificaram e 17 (26,99%) não apresentaram polimorfismo entre os parentais. Portanto, um total de 321 marcadores microssatélites foram testados e 199 (61,99%) foram polimórficos entre os parentais. Destes, 143 foram detectados em géis de poliácridamida 6% e 56 foram detectados em géis de agarose 5%. O índice de polimorfismo detectado para estes marcadores está de acordo com o encontrado para outros cruzamentos interespecíficos usando as espécies silvestres *O. rufipogon* (62%, Septiningsih et al., 2003) e *O. glumaepatula* (61%, Rangel et al., 2007).

Dos 529 marcadores baseados em polimorfismo de in-del 40 (7,56%) foram polimórficos. Destes, 23 foram escolhidos para a análise de segregação de acordo com as suas posições nos cromossomos do arroz visando saturar regiões sub-representadas pelos marcadores microssatélites. As posições destes marcadores foram identificadas através do alinhamento das suas sequências com a sequência do genoma do arroz utilizando a ferramenta Blast (www.gramene.org). O baixo nível de polimorfismo apresentado por estes marcadores indica que eles representam regiões conservadas do genoma (Rangel et al., 2007).

Do total de 222 marcadores polimórficos, 156 foram mapeados, sendo 134 microssatélites e 22 baseados em polimorfismo de in-del (Figura 1). Os outros 66 marcadores foram excluídos do mapa pois não foram agrupados em nenhum grupo de ligação ou suas posições nos grupos foram diferentes das esperadas (www.gramene.org). Um total de 39 (25%) marcadores apresentaram desvio das segregações mendelianas esperadas (1:1). Isso pode ser explicado pelo fato de que o número de indivíduos utilizados para a obtenção dos dados de segregação foi pequeno (59), o que provocou perda da amostragem dos eventos de segregação. Além disso, desvios da segregação mendeliana esperada são normalmente observados em estudos de mapeamento utilizando cruzamentos interespecíficos. Estes desvios podem ser resultado da redução da frequência de recombinação devido à distância genética entre os parentais e aborto de gametas (Rangel et al., 2007). No mapa construído no presente estudo esses efeitos ficaram bastante evidentes, pois determinadas regiões do genoma, como por exemplo a ponta do cromossomo 9, não puderam ser representadas por nenhum dos marcadores moleculares testados.

O mapa obtido apresentou 12 grupos de ligação representando os 12 cromossomos do arroz (Figura 1). O tamanho total do mapa foi 1840.69cM, sendo que o tamanho de cada cromossomo variou de 74.96cM (cromossomo 9) a 252.28cM (cromossomo 3). O número médio de marcadores em cada cromossomo foi 13, variando de 8 (cromossomos 11 e 12) a 20 (cromossomo 1). Os marcadores de in-del não amostraram as regiões de falha nos cromossomos, indicando que essas regiões podem estar sendo sub-representadas devido ao fato de que, neste cruzamento interespecífico, as estimativas das frequências de recombinação ficaram prejudicadas devido ao alto índice de esterilidade nos gametas. Todos os marcadores mapeados estão sendo utilizados para a genotipagem de 142 indivíduos RC2F2 provenientes deste cruzamento interespecífico. Esta população está sendo avaliada em campo



experimental para características relacionadas à tolerância à seca e os dados fenotípicos serão utilizados para o mapeamento de QTLs.

4. Referências bibliográficas

- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement. **Euphytica**.v.142, p.169-196. 2005.
- LIU, L.; LAFITTE, R.; GUAN, D. Wild *Oryza* species as potential sources of drought-adaptive traits. **Euphytica**. v.138, 149-161. 2004.
- MORAIS, O.P.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.A.; GUIMARÃES, E.P.; CHATEL, M.; OSPINA, Y.; LOPES, A.M.; PEREIRA, J.A.; UTUMI, M.M.; CENTENO, A.C.; FONSECA, J.R.; BRESEGHELLO, F.; GUIMARÃES, C.M.; BASSINELLO, P.Z.; PRABHU, A.S.; FERREIRA, E.; SOUZA, N.R.G.; SOUZA, M.A.; REIS, M.S.; SANTOS, P.G. **BRSMG Curinga: Cultivar de arroz de terras altas com ampla adaptação para o Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 8p. 2005.
- RANGEL, P.N; BRONDANI, R.P.V; COELHO A.S.G.; BRONDANI, C. Comparative linkage mapping of *Oryza glumaepatula* and *Oryza sativa* interspecific crosses based on microsatellite and expressed sequence tag markers. **Genetics and Molecular Biology**. v.30, p.614-622. 2007.
- SEPTININGSIH, E.M.; PRASETIYONO, J.; LUBIS, E.; TAI, T.H.; TJUBARYAT, T.; MOELJOPAWIRO, S.; MCCOUCH, S.R. Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 107, p.1419-1432. 2003.
- TUONG, T.P.; BOUMAN, B.A.M. Rice production in water-scarce environments. In: KIJNE, W.; BARKER, R.; MOLDEN, D. **Water Productivity in Agriculture: Limits and Opportunities for Improvement**. 1ed. Manila: International Rice Research Institute. p.53-67. 2003.

FONTE DE FINANCIAMENTO: Fagro/Embrapa, UFG.

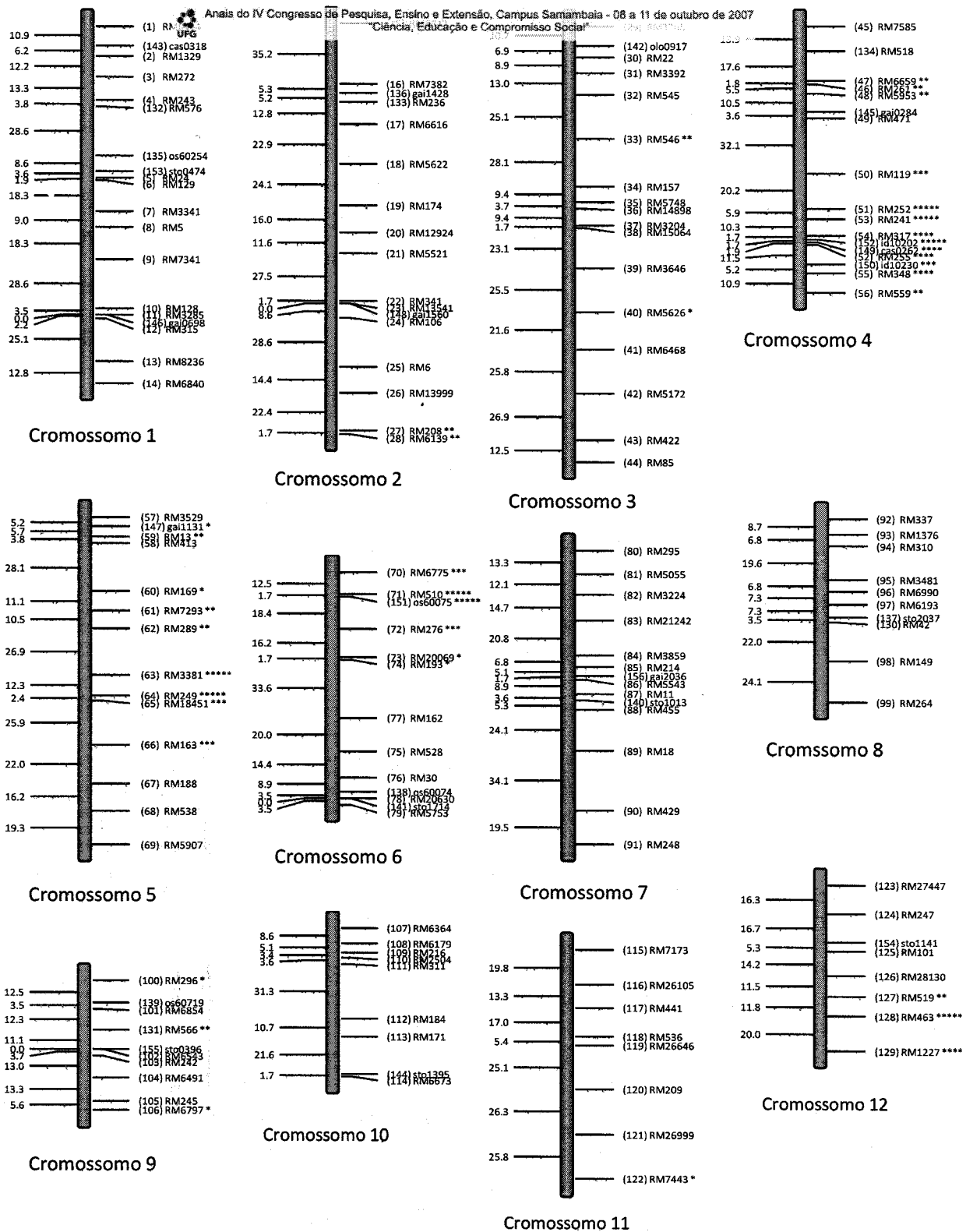


Figura 1. Mapa de ligação do cruzamento *O. glumaepatula* (GEN1233) X *O. sativa* (Curingã).