

ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL E DETERMINAÇÃO DO FLUXO GÊNICO ENTRE POPULAÇÕES DE ARROZ VERMELHO

Goulart, I.C.G.R.¹; Kupas, V.²; Dias, L.P.²; Rosa, T.M.³; Borba, T.C.O.⁴; Menezes, V.G.⁵; Merotto Jr., A.⁶

Palavras-chave: fecundação cruzada; imidazolinonas; *Oryza sativa*, resistência.

INTRODUÇÃO

Diversas populações de arroz vermelho foram identificadas como resistentes a herbicidas imidazolinonas no RS (MENEZES *et al.*, 2009). Aproximadamente 13% destas populações estudadas apresentaram mutações iguais às presentes nas cultivares PUITÁ INTA CL e SATOR CL, e mais de 80% apresentaram a mesma mutação que a IRGA 422 CL (ROSO *et al.*, 2010). Estes resultados indicam a ocorrência de fluxo gênico entre cultivares de arroz resistentes às imidazolinonas e arroz vermelho nas lavouras do RS. Ainda, após introgrida em arroz vermelho, a resistência a herbicidas pode ser distribuída para outras populações por fluxo gênico através de eventos de migração como sementes contaminadas e em conjunto com máquinas e implementos. O fluxo gênico, também conhecido como migração, refere-se ao processo de troca de genes entre populações normalmente da mesma espécie, podendo, porém, ocorrer entre espécies muito próximas filogeneticamente. A rápida evolução da resistência de arroz vermelho às imidazolinonas pode ser explicada não somente pelo fluxo gênico de pólen entre plantas resistentes e suscetíveis, mas também pelo fluxo de sementes de arroz vermelho resistente entre lavouras. A predominância de autogamia no gênero *Oryza* determina que o fluxo gênico seja comumente restrito, e que ocorra alta diversidade genética entre populações geograficamente ou ecologicamente distantes. Apesar do problema que o arroz vermelho representa para a cultura do arroz no Brasil, o conhecimento de sua diversidade genética no Brasil ainda é limitado. Ainda, não existem estudos relacionados à estrutura populacional de arroz vermelho que indiquem os parâmetros genéticos de migração na região Sul do Brasil. Entretanto, diversos marcadores moleculares utilizados para o arroz cultivado tem sido utilizados para caracterização genética do arroz vermelho em vários outros locais (CAO *et al.*, 2006), e representam uma ferramenta de fácil utilização. A determinação das práticas de prevenção a ocorrência de arroz vermelho resistente a herbicidas necessita do efetivo conhecimento da ocorrência de fluxo gênico entre populações para que recomendações específicas e efetivas em função da magnitude da ocorrência de eventos de migração e da diversidade genética de arroz vermelho. O objetivo do trabalho foi caracterizar geneticamente populações de arroz vermelho do RS com suspeita de resistência aos herbicidas imidazolinonas e elucidar aspectos relacionados ao fluxo gênico de sementes entre diferentes locais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA Arroz e Feijão. Foram utilizadas 27 populações de arroz vermelho RS coletadas na safra 2009/2010 (Figura 1). Cada população foi composta de 20 panículas de 20 plantas distintas. As coletas foram realizadas em lavouras de arroz com suspeita de ocorrência de arroz vermelho resistente aos herbicidas imazethapyr e imazapic. As populações de arroz vermelho foram fenotipadas quanto à resistência ao herbicida imazethapyr. Foram utilizados 24 marcadores moleculares SSR organizados em quatro painéis conforme descrição apresentada em Borba *et al.* (2009). As PCRs foram conduzidas em um volume final de 5 µL contendo 3 ng

¹ Eng Agr, MSc, Depto de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, goulart@ufrgs.br

² Bolsista IC, Acadêmico da Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

³ Bolsista IC - EMBRAPA Arroz e Feijão, acadêmica da Faculdade de Ciências Biológicas, UFG, Goiânia, GO.

⁴ Eng Alim, Dr, EMBRAPA Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO.

⁵ Eng Agr, MSc, Equipe de Agronomia, Instituto Riograndense do Arroz, IRGA, Cachoeirinha, RS.

⁶ Eng Agr, PhD, Depto de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, merotto@ufrgs.br

de DNA; concentrações otimizadas de cada par de iniciadores forward e reverse (BORBA *et al.*, 2009); 2,5 µL de Master Mix (QIAGEN) e 0,5 µL de Qsolution (QIAGEN). Os fragmentos foram analisados em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

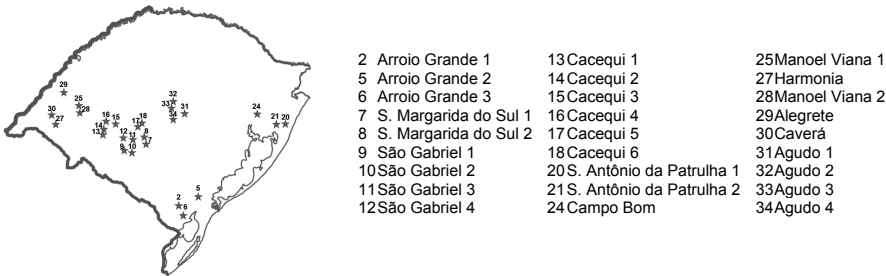


Figura 1. Origem geográfica de 27 populações de arroz vermelho coletadas no RS.

Foi estimado para cada população e para cada marcador SSR o número médio de alelos, a heterozigosidade esperada, a heterozigosidade observada e o conteúdo de informação polimórfica (PIC), o coeficiente de endogamia e a matriz de distâncias genéticas de Nei. Foi construída a partir da matriz de distâncias genéticas das populações um dendrograma baseado no método UPGMA. Com o objetivo de visualizar a relação genética entre os indivíduos componentes de cada população, foi obtida a matriz de distâncias genéticas de Nei entre pares de indivíduos. A partir desta matriz foi realizada a análise de componentes principais (ACP). Para a determinação da correlação entre a distância genética e a distância geográfica das populações de arroz vermelho foi realizado o teste de Mantel. Os dados foram submetidos à análise da variância molecular (AMOVA) pelo software Arlequin 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). A presença de estruturação entre as 27 populações de arroz vermelho foi determinada pelo software STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que as populações de arroz vermelho do RS apresentam diversidade genética relativamente alta entre os indivíduos, embora exista considerável variação entre estas populações, na média dos indivíduos. Neste sentido a AMOVA indicou que a variação genética dos 534 acessos de arroz vermelho avaliados foi de 26% entre populações e de 74% dentro das populações (Tabela 1). Assim, o valor de F_{ST} obtido pela AMOVA foi de 0,26. Isto indica que a variabilidade genética nas populações de arroz vermelho está relacionada, sobretudo, à diversidade dentro de cada população em comparação com a variabilidade entre populações.

Tabela 1. Análise de variância molecular (AMOVA) das 27 populações de arroz vermelho baseada na análise de 24 marcadores SSR e fluxo gênico (Nm).

Fonte da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Componentes da Variação	Porcentagem de Variação	Valor P
Entre Populações	26	5016,686	8,542	26%	0,001
Dentro de Populações	507	12171,576	24,007	74%	0,001
Total	533	17188,262	32,549		
Fluxo gênico (Nm = [(1 / F_{ST}) - 1] / 4)	0,7				

De forma geral, em populações naturais de espécies autógamas é esperada baixa diversidade genética devido ao alto grau de homozigose. Entretanto, em se tratando de populações advindas de áreas de cultivo, como o arroz vermelho, a diversidade dentro das populações pode ser mais elevada. Isso é possível devido à seleção imposta por práticas como o rouging, por exemplo. Isso resulta na seleção de indivíduos oriundos de fluxo

gênico com as cultivares que são fenotipicamente semelhantes às plantas cultivadas (CAO *et al.*, 2006). Além disso, a transferência de alelos de cultivares de arroz para populações de arroz vermelho através do fluxo gênico pode aumentar sua diversidade. O fluxo gênico entre lavouras aumenta igualmente a diversidade genética de populações (CAO *et al.*, 2006). A diferenciação genética, ilustrada pelo F_{ST} entre as populações de arroz vermelho no presente estudo é alta. Isto é devido provavelmente ao sistema de fecundação predominante no arroz vermelho que é a autogamia.

O resultado do teste de Mantel indicou que não há correlação ($R^2=0,06$) entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas das populações de arroz vermelho. Da mesma forma, os resultados da ACP indicaram que os indivíduos foram agrupados em três grupos, havendo uma interface entre dois deles com alguns indivíduos localizados de forma intermediária (Figura 1A). As cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL foram agrupadas próximas entre si, enquanto que Sator CL, embora no mesmo grupo, apresentou certa distância das demais. Estes resultados foram semelhantes aos observados no dendrograma UPGMA (dados não apresentados). Diversos indivíduos de uma mesma população foram alocados em grupos diferentes (Figura 1A). Esses indivíduos podem ser originados de introduções de sementes de arroz vermelho contaminantes de arroz cultivado ou sementes de outras populações de arroz vermelho que foram eventualmente transportadas para os locais das respectivas coletas.

A análise da estrutura das populações ($K=6$) confirmou a ancestralidade comum entre as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL ao colocá-las juntas no grupo K1 (Figura 1C). A maior parte dos indivíduos de arroz vermelho pertenceu ao grupo K1 (Figura 1B). O agrupamento de população de arroz vermelho suscetível no mesmo grupo K das cultivares resistentes a imidazolinonas indica que tais populações sofreram fluxo gênico anterior à utilização destas. Esse fluxo gênico provavelmente ocorreu a partir da cultivar IRGA 417, e não com as cultivares IRGA 422 CL ou PUITÁ INTA CL. Em diversos casos grupos diferentes foram atribuídos a indivíduos de uma mesma população (Figura 1B).

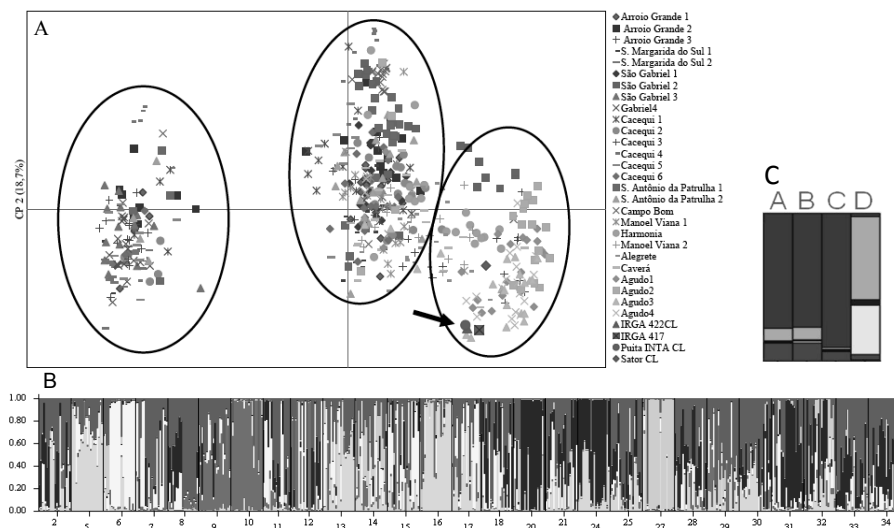


Figura 1. (1) Análise de componentes principais (ACP) de 27 populações de arroz vermelho do RS. A seta indica a posição das cultivares IRGA 417, IRGA 422CL e PUITÁ INTA CL. (2) Estrutura populacional obtida pela análise STRUCTURE. No detalhe (3), A, B, C e D representam IRGA 417, IRGA 422CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL, respectivamente. A numeração das populações corresponde àquelas listadas na Tabela 1.

Isso prova a ocorrência do fluxo de sementes de arroz vermelho entre lavouras de arroz, tanto suscetíveis como resistentes às imidazolinonas. Além disso, as populações suscetíveis encontradas neste estudo são geneticamente distintas das populações resistentes.

O método utilizado no presente estudo foi mais informativo que os utilizados anteriormente no Brasil, sobretudo em se tratando da resistência de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas. As populações de arroz vermelho no País foram caracterizadas bioquímica e geneticamente (MALONE *et al.*, 2007) e morfológicamente (SCHWANKE *et al.*, 2008). No presente estudo, foram utilizada amostra de maior tamanho e marcadores mais informativos. Por outro lado, métodos semelhantes aos empregados no presente trabalho foram utilizados em populações de arroz vermelho de outros locais do mundo (CAO *et al.*, 2006; GEALY *et al.*, 2009; SHIVRAIN *et al.*, 2010). Entretanto, estes trabalhos não compararam geneticamente cultivares de arroz resistente a herbicidas com populações de arroz vermelho a fim de estudar a relação entre estas como apresentado no presente estudo. Os resultados do presente estudo indicam, por exemplo, baixa diversidade genética, como resultado de baixa ocorrência de migração de sementes nas populações 5, 6, 10, 16 e 27 (Figura 1c). Ainda, observa-se que na população 27 dois indivíduos apresentam alta variabilidade genética em relação aos demais integrantes da população. Estes indivíduos possivelmente representam contaminantes de sementes que foram introduzidos recentemente na população (Figura 1c).

CONCLUSÕES

Os resultados observados confirmam a ocorrência da origem da resistência a herbicidas em arroz vermelho devida, sobretudo ao fluxo gênico de sementes e pólen. No entanto, populações geneticamente isoladas também foram identificadas. O sistema de análise da estrutura de populações utilizados neste estudo possibilita a identificação do isolamento genético e da intensidade de fluxo gênico em populações de arroz vermelho como ferramenta para o diagnóstico específico de populações que apresentaram aporte de sementes contaminadas de arroz vermelho, e também para o diagnóstico regional da maior importância do fluxo gênico em detrimento de processos independentes em relação a origem da resistência a herbicidas em arroz vermelho.

REFERÊNCIAS

- BORBA, T. C. O., *et al.* Microsatellite marker-mediated analysis of the EMBRAPA Rice Core Collection genetic diversity. *Genetica*, v. 137, n. 3, p. 293-304, 2009.
- CAO, Q., *et al.* Genetic Diversity and Origin of Weedy Rice (*Oryza sativa* f.) Populations Found in North-eastern China Revealed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Annals of Botany*, v. 98, n. 6, p. 1241-1252, 2006.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. e SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 1, n., p. 47-50, 2005.
- GEALY, D. R., AGRAMA, H. A. e EIZENGA, G. C. Exploring Genetic and Spatial Structure of US Weedy Red Rice (*Oryza sativa*) in Relation to Rice Relatives Worldwide. *Weed Science*, v. 57, n. 6, p. 627-643, 2009.
- MALONE, G., *et al.* Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 37, n. 2, p. 77-85, 2007.
- MENEZES, V. G., *et al.* Arroz-vermelho (*Oryza sativa*) resistente aos herbicidas imidazolinonas. *Planta Daninha*, v. 27, n., p. 1047-1052, 2009.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. e DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- ROSO, A. C., *et al.* Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. *Field Crops Research*, v. 119, n. 1, p. 175-182, 2010.
- SCHWANKE, A. M. L., *et al.* Caracterização morfológica de ecótipos de arroz daninho (*Oryza sativa*) provenientes de áreas de arroz irrigado. *Planta Daninha*, v. 26, n., p. 249-260, 2008.
- SHIVRAIN, V. K., *et al.* Genetic diversity of weedy red rice (*Oryza sativa*) in Arkansas, USA. *Weed Research*, v. 50, n. 4, p. 289-302, 2010.