

FLUXO GÊNICO A PARTIR DE PLANTAS DE ARROZ VERMELHO E ARROZ CULTIVADO EM CONDIÇÕES CAMPO

Goulart, I.C.G.R.¹; Merotto Jr., A.²; Kupas, V.³; Bortoly, E. D.⁴; Menezes, V. G.⁵

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

INTRODUÇÃO

A utilização de cultivares de arroz resistentes a imidazolinonas tem proporcionado o controle de arroz vermelho, com incremento significativo no rendimento de grãos de arroz. No entanto, a ocorrência de fluxo gênico entre cultivares de arroz e biótipos de arroz vermelho é um entrave para o manejo desta planta daninha, devido à possibilidade de incorporação da resistência às imidazolinonas no arroz vermelho, impossibilitando seu controle.

Vários biótipos de arroz vermelho resistente aos inibidores de ALS foram identificados em lavouras de arroz irrigado do Brasil (MENEZES *et al.*, 2009). O mecanismo de resistência nesses biótipos foi o local de ação alterado, e as mutações presentes nos genes da ALS foram: Iguais aos das cultivares de arroz resistente IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL (ROSO *et al.* 2010a). Recentemente, foi elucidado que a origem da resistência do arroz vermelho no RS é principalmente devida ao fluxo gênico (GOULART, 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre a ocorrência de fluxo gênico das cultivares resistentes para o arroz vermelho. Em um trabalho realizado nos EUA foi detectado fluxo gênico de arroz vermelho para cultivares de arroz em taxas variando entre 0,01 e 0,2% (SHIVRAIN *et al.*, 2009a). Os autores afirmaram que dessa forma seria possível uma população de arroz vermelho resistente transferir a resistência para outras populações de arroz vermelho suscetíveis. Em outro trabalho, realizado no Brasil, foi constatado que houve fluxo gênico de arroz vermelho para uma linhagem de arroz resistente à glufosinato de amônio (NOLDIN *et al.*, 2002). O fluxo a partir de populações de arroz vermelho resistentes para outras suscetíveis é informação essencial, uma vez que plantas de arroz vermelho que se tornem resistentes passam a ser fonte dos genes que causam resistência. Isto permite a introgressão desse gene nas demais populações de arroz em outras áreas de cultivo. O objetivo deste trabalho foi quantificar, sob condições experimentais a campo, a hibridização a partir de arroz cultivado e arroz vermelho resistentes aos herbicidas imidazolinonas para o arroz vermelho suscetível.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação Experimental do Arroz - IRGA na safra 2009/2010. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, dispostos em parcela subdividida, com quatro repetições. Nas parcelas principais foram alocadas as plantas receptoras de pólen (receptoras), que corresponderam à cultivar IRGA 417 e ao biótipo de arroz vermelho suscetível, denominado AVS. Nas subparcelas foram alocadas as plantas doadoras de pólen (doadoras), que corresponderam às cultivares de arroz IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL e ao biótipo de arroz vermelho resistente às imidazolinonas, denominado AVR, que contém a mutação Gly₆₅₄Glu no gene da ALS. A medida de cada unidade experimental parcela foi de 7x7m, com área de 49m². As sementes das plantas doadoras foram semeadas em vasos em casa-de-vegetação, durante períodos anteriores e posteriores à semeadura das receptoras a fim de obter sincronia no florescimento. Utilizou-se a densidade de 85 kg ha⁻¹ e espaçamento entre linhas de 0,17 m na semeadura das plantas receptoras. O sistema de cultivo foi o convencional com uma aração e uma

¹ Eng Agr, MSc, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, goulart@ufrgs.br

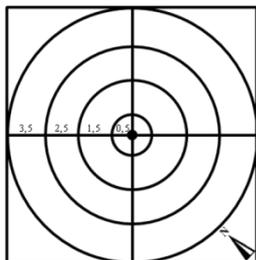
² Eng Agr, PhD, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, merotto@ufrgs.br

³ Bolsista IC, Acadêmico da Faculdade de Agronomia, UFRGS.

⁴ Eng Agr, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

⁵ Eng Agr, MSc, Equipe de Agronomia, EEA, IRGA.

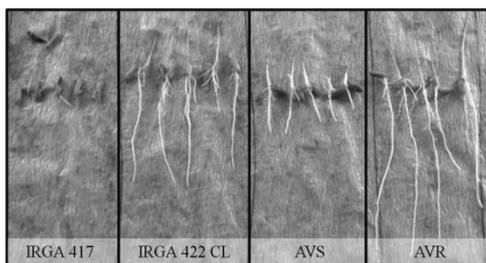
gradagem leve e os tratos culturais foram seguidos conforme SOSBAI (2010). Plantas de arroz vermelho ou arroz cultivado voluntárias foram eliminadas manualmente da área experimental durante todo o experimento. Quando as plantas receptoras estavam em estágio R3 (exsurgimento das panículas), da escala de Counce et al. (2000), uma planta doadora em estágio R4 (antese) foi transplantada para o centro da respectiva unidade experimental conforme aleatorização do delineamento experimental. Ao final do estágio R4 das plantas doadoras, estas foram trocadas e repostas por outras em R4 em cada unidade experimental, a fim de garantir o fornecimento de pólen às receptoras até que estas chegassem ao final do estágio R4. Imediatamente após o final do florescimento das plantas receptoras, as plantas doadoras foram eliminadas da área experimental para evitar contaminações no momento das coletas de sementes para análise de fluxo gênico.



▲ FIGURA 1. Esquema de uma parcela do experimento de quantificação do fluxo gênico em condições de campo. O círculo preto ao centro representa a planta doadora de pólen. Os valores indicam o raio do semicírculo.

A colheita das plantas receptoras foi realizada ao final do estágio de maturação dos grãos (R8-R9). Foram coletadas todas as panículas de quatro semicírculos concêntricos em relação ao centro da unidade experimental, a partir da distância de 0,5; 1,5; 2,5 e 3,5m, em quatro direções totalizando 16 amostras por unidade experimental (Figura 1). Para determinar o tamanho da amostra ("n") na detecção de híbridos em ensaio de fluxo gênico, foram utilizadas equações propostas por Jhala et al. (2010). Para detectar o fluxo gênico entre plantas de arroz com um nível de confiança de 95% e um poder de 0,8 do teste, o "n" necessário estimado foi estimado em 1989 sementes por avaliação.

A detecção de indivíduos resistentes via fluxo gênico foi realizada pelo bioensaio de embebição de sementes em solução de 0,2 mM de imazethapyr. Após a embebição, as sementes foram acondicionadas em folhas de papel germinador sob a forma de rolo. A germinação ocorreu em câmara de germinação sob a temperatura de 25°C por cinco dias. As avaliações ocorreram seis dias após a embebição. As sementes resistentes e suscetíveis foram discriminadas pelo comprimento radicular. Para tanto, as raízes das sementes foram comparadas às da cultivar IRGA 417 e do arroz vermelho suscetível e às da cultivar IRGA 422 CL e do arroz vermelho resistente (Figura 2).



◀ Figura 2. Sementes de IRGA 417, IRGA 422 CL, arroz vermelho suscetível (AVS) e arroz vermelho resistente (AVR) aos herbicidas imidazolinonas aos seis dias após a embebição em solução de imazethapyr a 0,2 mM e posterior germinação em câmara de germinação a 25°C.

As plântulas selecionadas como resistentes no bioensaio de germinação foram transplantadas em vasos e quando atingiram estágio V4 foram aspergidas com imazethapyr na dose de 100g ha^{-1} . Este procedimento

foi realizado para eliminar falsos positivos, uma vez que a seleção das plantas receptoras resistentes nos bioensaios foi realizada visualmente. Posteriormente, foi extraído DNA de 32 plantas selecionadas aleatoriamente identificadas como híbridos utilizando-se protocolo padrão. Foram utilizados marcadores moleculares SNP (Single Nucleotide Polymorphism) desenvolvidos por Roso et al. (2010a) para identificar as mutações presentes em cada planta receptora e observar se estas corresponderam às mutações das respectivas plantas doadoras. A quantificação do fluxo gênico foi realizada com base na análise de frequência

de híbridos, obtidos em função do número de indivíduos resistentes em relação ao total de sementes analisadas. Os dados foram submetidos à análise variância e, havendo significância, foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de indivíduos analisados foi de 1 024 000. As mutações observadas na análise com os marcadores SNP confirmaram que as plântulas de arroz vermelho e de IRGA 417 detectadas pelo bioensaio como resistentes são híbridas oriundas de fluxo gênico entre estas e o arroz vermelho resistente, ou as cultivares IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL (dados não mostrados). Ao se comparar as plantas receptoras de pólen, observou-se que o arroz vermelho suscetível foi mais propenso à ocorrência de fluxo gênico que a cultivar IRGA 417 (Tabela 1).

Tabela 1. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes às imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função das plantas receptoras.

Receptor de pólen	Sementes testadas	Plantas resistentes detectadas	Fluxo gênico (%)
Arroz vermelho suscetível	512000	176	0,0344 A
IRGA 417	512000	73	0,0142 B

Médias diferentes de acordo com o teste de Tukey à 5%.

A proporção de alogamia é normalmente menor em genótipos de arroz cultivados em comparação com genótipos silvestres (GEALY *et al.*, 2003). Outros autores mencionam que a presença de estigmas curtos limita a recepção de pólen de outros indivíduos em arroz cultivado (MESSEGUER *et al.*, 2001) e que, por outro lado, espécies silvestres possuem estigmas longos e abertos, o que favorece a captura de pólen de outras espiguetas (SONG *et al.*, 2003). O resultado de que o arroz vermelho é mais receptivo ao pólen de outras plantas evidencia que o fluxo gênico ocorre mais intensamente no sentido da cultivar para o arroz vermelho (Tabela 1).

Não houve variação significativa no fator doador de pólen (Tabela 2). Com isso, as cultivares resistentes IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL, Sator CL e o biótipo de arroz vermelho resistente foram iguais em relação à variável fluxo gênico, que ficou em torno de 0,02% (Tabela 2). Esses resultados indicaram que o arroz vermelho resistente transmite os alelos para populações suscetíveis em um nível igual ao que ocorre com as cultivares resistentes.

Tabela 2. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes às imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função das plantas doadoras.

Doador de pólen	Sementes testadas	Plantas resistentes detectadas	Fluxo gênico (%)
Arroz vermelho resistente	256 000	57	0,0222 ^{NS}
Sator CL	256 000	68	0,0266
IRGA 422 CL	256 000	62	0,0242
PUITÁ INTA CL	256 000	50	0,0195

^{NS}Diferenças não significativas.

Embora na análise de variância a interação receptor/doador não tenha sido significativa, realizou-se análise pelo método dos mínimos quadrados ajustados pelo teste Tukey para comparar o fluxo gênico ocorrido em cada combinação de um receptor com cada doador (Tabela 3). O resultado dessa análise mostrou que a proporção de fluxo gênico detectada na combinação arroz vermelho suscetível/PUITÁ INTA CL foi igual à combinação IRGA 417/PUITÁ INTA CL e que, para as demais combinações, o fluxo gênico foi maior quando o receptor era o arroz vermelho suscetível (Tabela 3). Esta é mais uma evidência que o arroz vermelho suscetível foi mais receptivo que a cultivar IRGA 417 ao pólen de outros indivíduos.

O fator distância não teve efeito significativo ao nível de 5% (não mostrado). Isto ocorreu devido ao diâmetro limitado da unidade experimental utilizada neste experimento que permitiu avaliação de, no máximo, 3,5 m de distância da planta doadora. Da mesma

forma, a variação do fluxo gênico em relação à direção cardeal não foi significativa. Nas quatro direções avaliadas no experimento, o fluxo gênico observado foi de 0,02% aproximadamente (não mostrado).

TABELA 3. Fluxo gênico entre doadores de pólen resistentes a herbicidas imidazolinonas e receptores suscetíveis comparados pelo método dos mínimos quadrados ajustados pelo teste de Tukey.

Cruzamento	Fluxo gênico (%)	Cruzamento	Fluxo gênico (%)	Significância
AVS x AVR ¹	0,039	IRGA 417 x AVR	0,015	0,0001
AVS x IRGA 422 CL	0,035	IRGA 417 x IRGA 422 CL	0,013	0,002
AVS x PUITÁ INTA CL	0,024	IRGA 417 x PUITÁ INTA CL	0,015	0,691
AVS x Sator CL	0,039	IRGA 417 x Sator CL	0,014	0,0001

¹AVS, arroz vermelho suscetível a imidazolinonas. AVR, arroz vermelho resistente.

A frequência de fluxo gênico observada neste experimento é similar às observadas em outros estudos (MESSEGUER *et al.*, 2001; GEALY *et al.*, 2003). A grande quantidade de plantas por hectare em um cultivo de arroz, associado ao fato de que o fluxo gênico pode ocorrer por espiguetas e não por planta, aumenta intensamente a chance de ocorrência de fecundação cruzada entre plantas de arroz.

CONCLUSÕES

O fluxo gênico de cultivares de arroz e arroz vermelho resistentes às imidazolinonas para arroz vermelho em condições de cultivo no Sul do Brasil ocorre em taxas semelhantes às aquelas observadas em áreas de cultivo de arroz de outros países. A taxa de fluxo gênico a partir de plantas resistentes foi similar para as cultivares de arroz IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL e para o arroz vermelho resistente, e ficou em torno de 0.0195 a 0.0270 %. Ainda, a taxa de fluxo observada em arroz vermelho suscetível é maior que a de IRGA 417, indicando que o arroz vermelho é mais receptivo ao pólen de outras plantas. A distância e a direção cardeal do vento não afetaram o fluxo gênico entre os materiais testados.

REFERÊNCIAS

- GEALY, D. R., MITTEN, D. H. e RUTGER, J. N. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice: Implications for Weed Management. **Weed Technology**, v. 17, n. 3, p. 627-645, 2003.
- GOULART, I.C.G.R. **Gene flow and fitness variation in imidazolinone herbicide resistant red rice (*Oryza sativa* L.)**. Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, 2011. 201p.
- JHALA, A. J. et al. Pollen-mediated gene flow in flax (*Linum usitatissimum* L.): can genetically engineered and organic flax coexist? **Heredity**, v., n., p., 2010.
- MENEZES, V. G., et al. Arroz-vermelho (*Oryza sativa*) resistente aos herbicidas imidazolinonas. **Planta Daninha**, v. 27, n., p. 1047-1052, 2009.
- MESSEGUER, J. et al. 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**, v. 103, n. 8, p. 1151-1159, 2001.
- NOLDIN, J. A. et al. Potencial de cruzamento natural entre o arroz transgênico resistente ao herbicida glufosinato de amônio e o arroz daninho. **Planta Daninha**, v. 20, n., p. 243-251, 2002.
- 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, 2010a.
- ROSO, A. C., MEROTTO JR., A. e DELATORRE, C. A. Bioensaios para diagnóstico da resistência aos herbicidas imidazolinonas em arroz. **Planta Daninha**, v. 28, n., p. 411-419, 2010b.
- SHIVRAIN, V. K. et al. Gene flow from weedy red rice (*Oryza sativa* L.) to cultivated rice and fitness of hybrids. **Pest Management Science**, v. 65, n. 10, p. 1124-1129, 2009.
- SONG, Z. P. et al. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 657-665, 2003.