

## DETERMINAÇÃO DO FLUXO GÊNICO ENTRE CULTIVARES DE ARROZ RESISTENTE A HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS E ARROZ VERMELHO ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSATÉLITES

GOULART, I.C.G.R.<sup>1</sup>; MEROTTO JR., A.<sup>1</sup>; NUNES, A.L.<sup>1,2</sup>; KUPAS, V<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, [ives.clayton@ufrgs.br](mailto:ives.clayton@ufrgs.br)

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Campus Sertão

### Resumo

As cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas possibilitam o controle eficiente de arroz vermelho, que é um dos maiores problemas da cultura do arroz irrigado. Entretanto, foram encontrados biótipos de arroz vermelho resistentes à imidazolinonas distribuídos em várias regiões orizícolas do Sul do Brasil. A correta determinação de estratégias de prevenção e controle de arroz vermelho resistente requer o conhecimento dos processos envolvidos na origem da resistência a herbicidas. O objetivo do trabalho foi determinar se a origem da resistência a herbicidas em biótipos de arroz vermelho está relacionada ao processo de fluxo gênico a partir de cultivares de arroz, ou à seleção independente da resistência em diferentes populações. Foram avaliadas 10 amostras de arroz vermelho oriundos de cultivos comerciais de arroz irrigado. Após seleção e validação de diversos marcadores moleculares microssatélites foram utilizados os marcadores RM180, RM251 e 4797 para realização de análise genealógica comparativa entre cultivares de arroz e os biótipos de arroz vermelho. Os marcadores mostraram polimorfismos entre cultivares de arroz e arroz vermelho. Foram identificadas populações cuja origem da resistência é o fluxo gênico. Ainda, houve uma população de arroz vermelho apresentou indivíduo com resistência originada devido a fluxo gênico e outro devido a seleção independente. Dentre as plantas de arroz vermelho resistentes a herbicidas imidazolinonas analisadas neste estudo, indica-se que 40% possuem como origem da resistência o fluxo gênico a partir de cultivares resistentes e 60% são resultantes de processos independentes de evolução da resistência. Estes resultados indicam que a redução da evolução da resistência a herbicidas imidazolinonas em arroz vermelho exige adoção concomitante de medidas relacionadas com a prevenção a migração de sementes e também com a diminuição da pressão de seleção do herbicida.

**Palavras-chave:** fluxo gênico, arroz, arroz vermelho, *Oryza sativa*.

### Abstract

Imidazolinone resistant rice cultivars are a efficient strategy for selective control of red rice. However, imidazolinone resistant red rice biotypes are spread throughout Southern Brazil rice paddy fields. This problem is a new challenge to the rice crop in this region. The correct determination of prevention and control strategies of resistant red rice require the knowledge of the processes involved in the origin of red rice herbicide resistance. The objective of this study was to identify the origin of herbicide resistance in red rice biotypes according to the possibilities of gene flow from rice cultivars or to the independent selection of resistance in different populations. Ten samples of red rice from rice paddy fields were evaluated. Initially, several microsatellite markers were selected and evaluated for polymorphism and consistence. The microsatellite markers RM180, RM251 and 4797 were used to perform the comparative analysis between rice cultivars and red rice biotypes due the polymorphisms between rice cultivars and red rice hybrids. Gene flow from resistant cultivars was identified as the source of resistance in 40% of the red rice plants resistant to imidazolinone herbicides analyzed in this study, and 60% are the result of independent processes of evolution of resistance. Furthermore, there was one population of red rice resistant to imidazolinone herbicides due gene flow and independent selection concomitantly. These results indicate that the mitigation of red rice imidazolinone herbicide resistance evolution require both measures related to the crop sanitation and decreasing of herbicide selection pressure.

**Key Words:** gene flow, rice, red rice, *Oryza sativa*.

## Introdução

O arroz vermelho pertence à mesma espécie do arroz cultivado e isto limita seu controle através de herbicidas. Ainda, a adoção de métodos físicos ou culturais para o controle de arroz vermelho é limitada em lavouras de grande extensão. Cultivares de arroz resistente a herbicidas do grupo químico imidazolinonas foram desenvolvidas por meio de mutações induzidas (Croughan, 1994) proporcionando a utilização destes herbicidas na cultura do arroz para o controle de plantas daninhas em geral, e principalmente de arroz vermelho. Estas cultivares foram disponibilizadas comercialmente em 2002 nos EUA, e em outros países nos anos seguintes, proporcionando o controle de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) que é a planta infestante mais importante desta cultura, principalmente no Brasil. No entanto, a ocorrência de hibridização entre cultivares e biótipos de arroz vermelho possibilita a incorporação da resistência a herbicidas a partir de cultivares com esta característica, limitando o controle da planta daninha. 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 (Carrie & Loren, 2004).

As conseqüências do fluxo gênico da resistência a herbicidas desde o arroz cultivado para o arroz vermelho estão relacionadas e perda da estratégia de controle seletivo do arroz vermelho uma vez que estes indivíduos também se tornam resistentes ao agente de controle. Neste sentido, Menezes *et al.* (2009) identificaram a ocorrência de biótipos de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imazethapyr e imazapic em 56% de um total de 228 amostras analisadas. No entanto, ainda é desconhecido se a origem da resistência nestas populações aconteceu devido ao fluxo gênico a partir das cultivares resistentes, ou através de processos independentes de evolução. O objetivo do trabalho foi determinar se a origem da resistência a herbicidas em biótipos de arroz vermelho está relacionada ao processo de fluxo gênico a partir de cultivares de arroz, ou à seleção independente da resistência em diferentes populações.

## Material e métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Porto Alegre-RS. O material vegetal foi cedido pela Equipe de Agronomia do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA), e corresponde a 10 populações de arroz vermelho coletadas na safra de 2007/08, oriundas dos municípios Caçapava do Sul (população 47), São Martinho da Serra (população 48), Santa Maria (populações 50 e 51) e Restinga Seca (população 32). A resistência aos herbicidas imazethapyr + imazapic nestas populações foram obtidas das descrições apresentadas por Menezes *et al.* (2009).

A escolha dos marcadores foi realizada com bases em estudos nos quais marcadores SSR foram polimórficos para cultivares de arroz e arroz vermelho (Rajguru *et al.*, 2005; Brunes *et al.*, 2007; Shivrain *et al.*, 2007). Desta forma, para avaliar a existência de polimorfismos entre as cultivares de arroz resistentes a imidazolinonas e biótipos de arroz vermelho bem como detectar a genealogia de um indivíduo híbrido denominado H122, oriundo de cruzamento artificial entre a cultivar IRGA 422 e um biótipo de arroz vermelho, foram usados os seguintes pares de primers: RM 180, RM 251 e 4797 (Rajguru *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2007; Shivrain *et al.*, 2007). Os marcadores microssatélites que mostraram o polimorfismos foram o RM 251 e o 4797, e assim foram utilizados para determinar a origem da resistência nas amostras de populações de arroz vermelho deste estudo. Devido ao fato de os marcadores microssatélites serem co-dominantes, híbridos entre cultivares de arroz e arroz vermelho podem ser detectados pela presença dos alelos parentais na região dos géis correspondentes aos híbridos. A ocorrência de dois alelos, um referente a uma cultivar e outro referente ao arroz vermelho, indica a ocorrência do processo de fluxo gênico. Por outro lado, quando somente um alelo aparece na região correspondente do gel de agarose, os biótipos nos quais isso ocorra foram considerados resistentes por seleção independente (Shivrain *et al.*, 2007).

Previamente, foram realizados em casa de vegetação cruzamentos artificiais entre as cultivares de arroz irrigado IRGA 417, IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL e os biótipos de arroz vermelho AV110, AV122, AV120 e AV104. Com uma taxa de sucesso de aproximadamente 40% (dados não apresentados) obteve-se os híbridos 17110 (IRGA 417 x AV110), H122 (IRGA 422CL x AV122), P120 (Puita INTA CL x AV120) e S104 (Sator CL x AV104). Estes indivíduos são os tratamentos controle nas comparações dos biótipos de arroz vermelho resistentes a herbicidas em análise neste estudo. Para realização dos testes,

aproximadamente 150mg de tecido foliar de plantas jovens das cultivares de arroz irrigado, além dos biótipos de arroz vermelho foram utilizados para extração de DNA. Após a coleta, o material foi macerado em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido e a extração foi realizada conforme o protocolo convencional. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 1%, utilizando marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para amplificação das regiões de DNA flanqueadas pelos primers, foram realizadas reações em cadeia pela polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). As reações de PCR seguiram o seguinte protocolo: 20 ng de DNA, 0,3 µL de cada primer (*forward* e *reverse*), 150µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 0,5 U de Taq DNA polimerase, 1x buffer e; 0,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, em um volume total de 12 µL por reação. As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 12 µL contendo 20ng de DNA; PCR buffer 1x; 0,6 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,3µl de tanto forward como reverse primer; 150 µM de cada dNTP; 0,5 unidade de Taq polimerase; e 7, 94 ul de H<sub>2</sub>O miliQ. As reações de PCR foram sujeitas a 2 min de desnaturação a 95°C, 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 57°C, e 1min a 72°C. Os produtos da reação de PCR foram separados em gel de agarose (3 %) corados com brometo de etídeo e quantificados utilizando marcadores de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Posteriormente, o gel foi fotografado com auxílio do programa KODAK Digital Science 1D.

### Resultados e discussão

No presente estudo o marcador RM180 não resultou em polimorfismo entre as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL, arroz vermelho (AV) ou com o biótipo híbrido H122 (Figura 1A). O marcador microssatélite RM180 apresentou polimorfismo para as cultivares de arroz CL121, CL161 e biótipos de arroz vermelho em estudos realizados nos EUA (Rajguru *et al.*, 2005; Shivrain *et al.*, 2007). Nestes estudos, foram utilizadas as cultivares CL121 e a CL161 que não são utilizadas em lavouras de arroz no Sul do Brasil. Ainda, os biótipos de AV existentes em determinados locais caracterizam diferenças genotípicas em relação a outras populações, determinando níveis de variabilidade que podem resultar em variação da especificação de marcadores moleculares. Os fragmentos gerados tiveram em torno de 120 pares de base para RM180, que corresponde aos fragmentos encontrados por Shivrain *et al.* (2007). Já os marcadores RM251 e 4797 foram polimórficos para as mesmas comparações (Figura 1B e 1C). A amplificação do DNA das cultivares de arroz e dos biótipos de AV com o marcador RM251 produziu fragmentos de 115 e 130 pares de bases, respectivamente, e quando amplificados com o marcador 4797, os fragmentos tiveram aproximadamente este mesmo comprimento (Figura 1, Tabela 1). Estes fragmentos apresentam tamanho semelhante ao descrito em estudos com arroz nos quais estes marcadores foram utilizados (Rajguru *et al.*, 2005; Brunet *et al.*, 2007). Como os marcadores microssatélites apresentam co-dominância, espera-se a ocorrência de duas bandas na região do biótipo híbrido quando um marcador for polimórfico para cultivares e biótipos de AV. Este comportamento pode ser visualizado na Figura 1C e Figura 1C para o resultado da amplificação a partir do arroz híbrido H122, que mostrou a presença dos alelos das cultivares bem como dos biótipos de AV. Este resultado indica que os marcadores RM251 e 4797 podem ser utilizados na detecção de biótipos híbridos oriundos do fluxo gênico entre cultivares de arroz e AV.

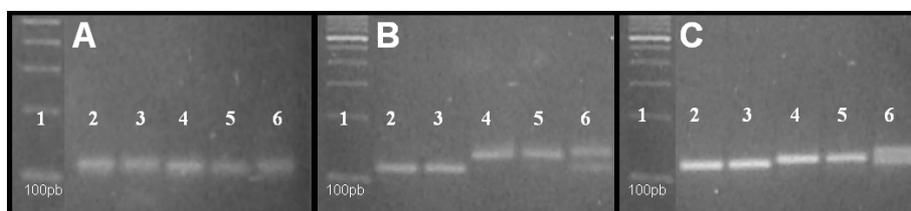


Figura 1. Gel de eletroforese em agarose (3%) de fragmentos de microssatélites nas cultivares IRGA 417, IRGA 422, arroz vermelho e híbrido artificial de IRGA 422 e arroz vermelho (H122) a partir dos marcadores RM180 (A), RM251 (B) e 4797 (C). Colunas: 1 - ladder 100pb; 2 – IRGA 417; 3 – IRGA 422; 4 – arroz vermelho suscetível à imidazolinonas; 5 – arroz vermelho resistente à imidazolinonas; e 6 – Híbrido H122.

O marcador 4797 gerou fragmentos de 120 pb para todas as cultivares de arroz, exceto Sator CL que obteve 115 pb, para dois AV de Santa Maria (pop. 50, coluna 16; pop. 51, coluna 18; Figura 2A) e para duas amostras de AV de Restinga Seca (pop. 32; colunas 17, 22 e 23; Figura

2A). Entretanto, um fragmento ao redor de 130 pb foi gerado para o híbrido H122, caracterizando-o como heterozigoto, apresentando os alelos parentais. Tais fragmentos, também ocorreram em AV oriundos de Santa Maria (pop. 50, colunas 19 e 20), sugerindo ter havido cruzamento entre a cultivar IRGA 422 CL e indivíduos dessas populações de AV. O trabalho desenvolvido por Roso et al. (2008) mostrou que estas populações contêm a mutação  $G_{654}E$  na enzima Acetolactato sintase (ALS) e tal mutação está presente na cultivar IRGA 422 CL. Estas evidências indicam ser o fluxo gênico o mecanismo responsável pela resistência desses indivíduos a herbicidas imidazolinonas. A população 50 de Santa Maria possui, portanto, indivíduos resistentes de origem distinta, sendo determinados evolução independente (coluna 16, Figura 2A) e fluxo gênico (colunas 19 e 20; Figura 2A) (Tabela 1).

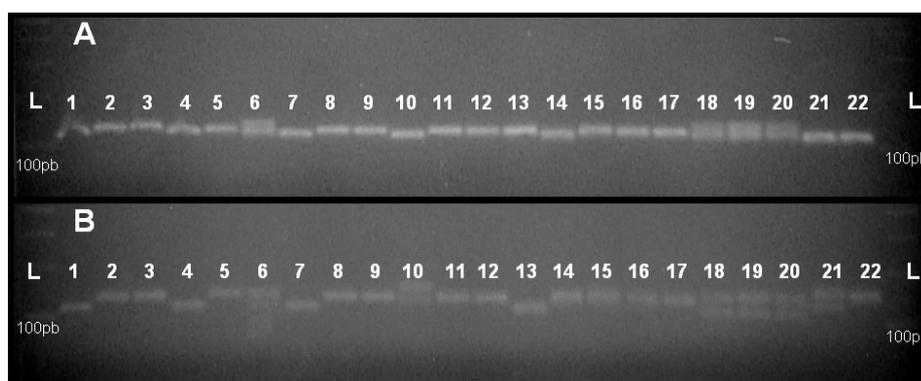


Figura 2. Gel de eletroforese em agarose (3%) de fragmentos de microssatélites nas cultivares IRGA 417, IRGA 422, Puita INTA CL, Sator CL, híbridos artificiais de cultivares de e arroz vermelho (AV), e biótipos de AV a partir dos marcadores e 4797 (A) e RM251 (B). Colunas: L - ladder 100pb; 1 - IRGA 417; 2 - AV110; 3 - 17110; 4 - IRGA 422; 5 - AV122; 6 - H122; 7 - Puita INTA CL; 8 - AV120; 9 - P120; 10 - Sator CL; 11 - AV104; 12 - S104; 13 - AV de Caçapava do Sul (população 47); 14 e 15 - AV de São Martinho da Serra (população 48); 16 - AV de Santa Maria (população 50); 17 - AV de Restinga Seca (população 32); 18 - AV de Santa Maria (população 51); 19 e 20 - AV de Santa Maria (população 50); 21 e 22 - AV de Restinga Seca (população 32).

O marcador RM251 apresentou polimorfismo entre a cultivar Sator CL e as demais (Figura 2B). O tamanho do fragmento encontrado para as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e Puita INTA CL foram de 115 pb. Já para Sator CL houve dois fragmentos (125 e 160pb) de origem parental visto que esta cultivar é obtida do cruzamento entre duas linhagens puras. Duas amostras da população 50 de Santa Maria apresentaram dois alelos com tamanhos de fragmentos semelhantes aos do híbrido H122 (120 e 150pb; Figura 2B, Tabela 1) e uma amostra teve apenas um alelo, indicando, assim como ocorreu com o marcador 4797, que nessa população possa ter ocorrido tanto evolução independente quanto fluxo gênico a partir da cultivar IRGA 422 CL (colunas 16, 19 e 20; Figura 2B). Das três amostras oriundas de Restinga Seca (pop. 32) duas apresentaram apenas um alelo enquanto uma apresentou os de 130 e 160pb (Tabela 1). O alelo de 160pb é semelhante ao observado na cultivar Sator CL, indicando fluxo gênico entre essa cultivar e a população 32, de Restinga Seca. A mutação presente em Sator CL é  $S_{653}N$  e foi encontrada nesta população por Roso et al. (2008). Salienta-se que a presença de um alelo apenas nas amostras indica que a resistência a imidazolinonas nesses indivíduos seja devida à seleção independente. Dessa forma, nas populações de Restinga Seca e Santa Maria (pop. 50) tanto o fluxo gênico quanto a evolução independente explicam a origem da resistência a imidazolinonas (Tabela 1).

Os marcadores microssatélites RM251 e 4797 são adequados para detectar hibridizações entre as cultivares IRGA 422 CL e Sator CL e biótipos de AV permitindo o conhecimento da origem da resistência em populações resistentes a herbicidas. Dentre as plantas de AV resistentes a herbicidas imidazolinonas analisadas neste estudo, indica-se que 40% possuem como origem da resistência o fluxo gênico a partir de cultivares resistentes e 60% são resultantes de processos independentes de evolução da resistência. A identificação da origem da resistência em arroz vermelho permite a determinação de critérios mais específicos para o manejo de cultivares de arroz resistente a herbicidas.

Os resultados deste estudo indicam que as medidas profiláticas relacionadas a evolução da resistência a herbicidas imidazolinonas devem considerar estratégias relacionadas a dispersão do gene de resistência entre populações, e também práticas de manejo voltadas

para a diminuição da pressão de seleção destes herbicidas. Assim sendo, a prevenção da ocorrência de arroz vermelho resistente a herbicidas deve ser reforçada com procedimentos relacionados a dispersão de sementes de arroz vermelho como a utilização de sementes certificadas, limpeza de equipamentos e prevenção da imigração de sementes. Ainda, a diminuição da pressão de seleção de herbicidas imidazolinonas no arroz vermelho está relacionada à utilização de diferentes mecanismos de ação, que no caso da cultura do arroz pode ser alcançada apenas através da rotação de culturas.

Tabela 1. Marcadores microssatélites utilizados para detecção de polimorfismo entre cultivares de arroz e arroz vermelho. TA: temperatura de pareamento.

Cultivar/Biótipo	ALS	Mutação	Fragmento (pb)	Fragmento (pb)	Origem da resistência
		ALS	4797	RM251	
IRGA 417	S	não contém	120	115	-
IRGA 422 CL	R	G <sub>654</sub> E	120	115	-
H122	R	G <sub>654</sub> E	120/130	115/145	-
Sator CL	R	S <sub>653</sub> N	120	125/160	-
População 47(13)	R	G <sub>654</sub> E	120	115	Seleção independente
População 48 (14)	R	G <sub>654</sub> E	120	125	Seleção independente
População 48 (15)	R	G <sub>654</sub> E	120	115	Seleção independente
População 50 (16)	R	G <sub>654</sub> E	120	125	Seleção independente
População 50 (19)	R	G <sub>654</sub> E	120/130	115/145	Fluxo gênico
População 50 (20)	R	G <sub>654</sub> E	120/130	115/145	Fluxo gênico
População 51 (18)	R	G <sub>654</sub> E	120/130	115/145	Fluxo gênico
População 32 (17)	R	S <sub>653</sub> N	120	125	Seleção independente
População 32 (21)	R	S <sub>653</sub> N	120	125/160	Fluxo gênico
População 32 (22)	R	S <sub>653</sub> N	120	145	Seleção independente

#### Literatura citada

- BRUNES, T. O., *et al.* Fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado estimado por meio de marcadores de microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 2, p., 2007.
- CARRIE, L. M. e LOREN, H. R. How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 6, p. 1341-1356, 2004.
- CROUGHAN, T. P. Application of tissue culture techniques to the development of herbicide resistant rice. **Louisiana Agriculture**, v. 37, n. 1, p. 25-26, 1994.
- MENEZES, V. G., *et al.* Arroz-vermelho (*Oryza sativa*) resistente aos herbicidas imidazolinonas. **Planta Daninha**, v. 27, n., p. 1047-1052, 2009.
- RAJGURU, S. N., *et al.* Mutations in the red rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. **Weed Sci.**, v. 53, n. 6, Nov-Dec, p. 946-946, 2005.
- RANGEL, P. N., *et al.* 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, n., p. 614-622, 2007.
- ROSO, A. C., *et al.* Determinação do mecanismo de resistência e das mutações do gene ALS em cultivares de arroz resistentes a herbicidas para identificação de híbridos através de marcadores SNP. 26º CBCPD, 2008, Ouro Preto, MG. 2008.
- SHIVRAIN, V. K., *et al.* Gene flow between Clearfield(TM) rice and red rice. **Crop Protection**, v. 26, n. 3, p. 349-356, 2007.