

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

FLUXO GÊNICO E VARIAÇÃO ADAPTATIVA DE ARROZ VERMELHO
(*Oryza sativa* L.) RESISTENTE AOS HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS

Ives Clayton Gomes dos Reis Goulart
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Herbologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2011

DEDICO

*Aos meus avós Heitor Silveira Goulart
e Elba Simões Lopes Goulart
(in memorian), aos meus pais
João Clézio Lopes Goulart e
Maria das Graças Gomes dos Reis e à
minha esposa Raquel Patro.*

*“There are no unlockable doors,
there are no unwinable wars,
there are no unrightable wrongs or
insingable songs...
There are no impossible dreams...
There are no unachievable goals...”*

Ozzy Osbourne

AGRADECIMENTOS

Ao professor Aldo Merotto Jr pela orientação bastante competente que garantiu a realização do trabalho, mesmo em momentos desafiadores. Agradeço também pelas horas de discussão científica que contribuíram para meu crescimento intelectual durante este período. Agradeço pela total liberdade de pensar e propor alternativas para os entraves no decorrer do trabalho. São ensinamentos que farão parte da minha atuação na ciência. Agradeço ainda pela amizade e pelas assistências nas partidas de futebol.

À minha esposa Raquel Patro, que me apoiou incondicionalmente, pelo amor, dedicação, amizade e compreensão. E apesar de todos os problemas que enfrentamos nesse período, estamos juntos e mais fortes para encarar novos desafios.

À minha família, meus pais Maria das Graças Gomes dos Reis e João Clézio Lopes Goulart por minha educação, exemplo e apoio. Agradeço a compreensão de todos vocês com a minha ausência em períodos intensos de estudo e pesquisa. Em especial aos meus sobrinhos Lucas, Nicolly, Jean, Caroline e Kauã, a quem espero que este sirva de exemplo para o árduo, porém gratificante, caminho dos estudos.

Ao pesquisador M.Sc. Valmir Gaedke Menezes da equipe de Agronomia do Instituto Rio Grandense do Arroz pela cessão da área experimental sem arroz vermelho, a qual praticamente destruimos ao semear 80 kg/ha dessa planta daninha. Obrigado aos pesquisadores M.Sc. Daniel Santos Grohs, M.Sc. Carlos Henrique Paim Mariot (agora na Dow Agrosiences) e aos funcionários e estagiários que contribuíram em algum momento na condução dos experimentos. Ainda, aos Engenheiros Agrônomos desta instituição que realizaram as coletas das populações de arroz vermelho no RS.

À pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão Dr. Tereza Cristina de Oliveira Borba pela ótima recepção, orientação e amizade durante minha estada em Goiás. Ainda, aos amigos que fiz naquela Unidade, que muito me ajudaram na realização da genotipagem do arroz vermelho.

Aos professores do Depto de Plantas de Lavoura Ribas A. Vidal, Christian Bredemeier, Luiz Carlos Federizzi, Carla Andrea Delatorre, André Luis Thomas, Paulo

Henrique de Oliveira e à professora do Depto de Genética da UFRGS Fernanda Bered pela ajuda em diversos momentos de dúvida (que foram muitos!) durante este período.

Em especial agradeço ao professor do Depto de Plantas de Lavoura Marcelo Teixeira Pacheco pelas contribuições essenciais em três dos quatro experimentos realizados neste trabalho.

Aos meus amigos, que acumulam o “cargo” de colegas, Augusto Kalsing, Michael S. Serpa, Felipe O. Matzenbacher, Anderson L. Nunes, Clever Varianni, Ana Carolina Roso, Daniela Barbosa, Vladirene M. Vieira, Taiguer Cerutti e Cibele T. Costa pela ativa troca de experiências, contribuições importantes, ensinamentos, palavras de conforto em momentos difíceis e principalmente pela amizade.

Aos demais colegas alunos de mestrado e doutorado do Depto de Plantas de Lavouras pela amizade e momentos de descontração, futebol (melhoramento ficou na frente por um gol de saldo!) e ajuda em momentos importantes.

Aos funcionários do Depto de Plantas de Lavoura Maria Alice Weber, Karina Pieretti e Fábio Martins Berndt pela competência e ajuda e amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica Valmir Kupas, André M. Leguisamo e Letícia P. Dias, e ao então estagiário de graduação Everton D. Bortoly pelo auxílio na condução e execução dos experimentos.

Aos companheiros de futebol que em todas as quartas-feiras de descontração, com churrasco e cerveja me ajudaram a relaxar mesmo em momentos de pura tensão. Agradeço ainda por aturarem minha chatice em campo (estou tentando melhorar!).

Às pessoas que contribuíram de qualquer forma para realização deste trabalho cujos nomes não estão citados aqui devido à limitação de espaço.

Aos cidadãos do meu País, que através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), financiaram esta pesquisa. Espero que os resultados aqui encontrados sejam úteis à sociedade brasileira.

FLUXO GÊNICO E VARIAÇÃO ADAPTATIVA DE ARROZ VERMELHO (*Oryza sativa* L.) RESISTENTE AOS HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS¹

Autor: Ives Clayton Gomes dos Reis Goulart

Orientador: Aldo Merotto Junior

RESUMO

O arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) é a principal planta daninha da cultura do arroz e o seu controle em lavouras comerciais é difícil. As cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas proporcionaram o controle seletivo do arroz vermelho. Porém, nos últimos anos surgiram populações de arroz vermelho resistentes a estes herbicidas. Os objetivos desta pesquisa foram elucidar a importância do fluxo gênico e da seleção independente como processos de origem da resistência de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas no RS; quantificar o fluxo gênico a partir de plantas de arroz vermelho resistentes para plantas de arroz vermelho suscetíveis em condições de cultivo; avaliar a ocorrência de fluxo gênico entre populações de arroz vermelho no RS; e identificar alterações na adaptação de arroz resistente a estes herbicidas baseado no padrão da germinação de sementes. Foram utilizadas 176 indivíduos de arroz vermelho resistentes e suscetíveis aos herbicidas imidazolinonas coletadas no RS e as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL, Sator CL e Puita INTA CL. A origem da resistência foi avaliada baseada em quatro marcadores moleculares *single sequence repeats* (SSR) e três *single nucleotide polymorphism* (SNP). O fluxo gênico entre plantas foi realizado em ensaio à campo e a avaliação foi realizada com marcadores fenotípico resistência a imidazolinonas e molecular SNP. O fluxo gênico entre lavouras foi avaliado em 27 populações através de 24 marcadores SSR. A alteração na adaptação de plantas de arroz resistentes foi realizada com base em parâmetros germinativos relacionados à resistência a imidazolinonas. A resistência devida ao fluxo gênico a partir de cultivares resistentes ou à seleção da mutação pelo uso contínuo destes herbicidas ocorreu em 98,9% e 1,1% dos indivíduos, respectivamente. A taxa média de fluxo gênico entre plantas foi de 0,0243%. O arroz vermelho foi mais receptivo ao pólen (0,0344%) que à cultivar IRGA 417 (0,0142%). Baseado no F_{ST} de 0,26 encontrado para as populações estudadas o índice estimado de fluxo gênico Nm foi de 0,7. A estruturação populacional indicou haver fluxo de sementes entre lavouras de arroz. As cultivares resistentes alcançaram 50% de germinação em menos tempo que a cultivar suscetível IRGA 417. Estes resultados sugerem que o manejo do arroz vermelho deve ser baseado na redução da pressão de seleção devida ao uso contínuo de herbicidas imidazolinonas e principalmente na mitigação do fluxo gênico de pólen e sementes.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (202p.) Março, 2011.

GENE FLOW AND FITNESS VARIATION IN IMIDAZOLINONE HERBICIDE-RESISTANT RED RICE (*Oryza sativa* L.)¹

Author: Ives Clayton Gomes dos Reis Goulart
Adviser: Aldo Merotto Junior

ABSTRACT

Red rice (*Oryza sativa* L.) is the most important weed in the paddy field rice, and its control in large scale fields is difficult. The imidazolinone herbicide resistant rice cultivars provide selective red rice control. However, in recent years have been emerged red rice populations resistant to these herbicides. This study aimed to elucidate the relative importance of the gene flow and independent selection as origin process to the imidazolinone resistance in red rice; to quantify the gene flow among imidazolinone resistant red rice and susceptible red rice plants in paddy field conditions; to evaluate the occurrence of the gene flow among red rice populations in RS state; to identify variations in fitness of the imidazolinone resistant rice plants based on the seed germination pattern. Plant material consisted of 176 red rice individuals resistant and susceptible to the imidazolinone herbicides collected in RS and the rice cultivars IRGA 417, IRGA 422 CL, Sator CL and Puita INTA CL. The origin of the resistance was determinate based on four simple sequence repeats (SSR) and three single nucleotide polymorphism (SNP) molecular markers. The gene flow among red rice plants was studied in a paddy field experiment and the evaluation was based on the imidazolinone resistance trait and three SNP molecular markers. In addition, a gene flow among red rice 27 populations was carried out based on 24 SSR molecular markers. The variation in fitness of the resistant rice plants was based on the germination parameters related to the imidazolinone resistance. The imidazolinone resistance origin due to gene flow from resistant cultivars and from independent mutation selection occurred in 98,9% and 1,1% of the individuals, respectively. The mean gene flow rate among plants was 0,0243%. Red rice was more receptive to pollen (0,0344%) than the susceptible cultivar IRGA 417 (0,0142%). Based on the F_{ST} of 0,26, the estimated gene flow index Nm was 0,7. The population structure indicated that there is seed flow among rice paddy fields. All the imidazolinone resistant cultivars reached 50% of germination faster than the susceptible cultivar IRGA 417. These results suggest that the management of the red rice should be based on reduction of the selection pressure due to the continuous use of the imidazolinone herbicides and mainly on the mitigation of the seed and pollen gene flow.

¹Master of Science Dissertation in Crop Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (202p.) March, 2011.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A cultura do arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	5
2.2 Arroz vermelho (<i>Oryza sativa</i> L.)	6
2.3 Cultivares de arroz e arroz vermelho resistentes às imidazolinonas	10
2.4 Fluxo gênico	13
2.5 Alteração na adaptação de plantas resistentes a herbicidas	19
2.6 Diversidade genética de populações de <i>Oryza sativa</i> L.	23
2.6.1 Utilização de marcadores SSR na avaliação da diversidade genética	25
2.6.2 Análises de variabilidade e estrutura genética	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Determinação da origem da resistência de arroz vermelho	31
3.1.1 Material Vegetal	31
3.1.2 Extração de DNA e análise molecular por marcadores SSR	32
3.2 Quantificação do fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente e entre populações de arroz vermelho do RS	38
3.2.1 Fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente às imidazolinonas	38
3.2.1.1 Material vegetal e delineamento experimental.....	38
3.2.1.2 Instalação e condução do experimento.....	39
3.2.1.3 Determinação do tamanho da amostra	41
3.2.1.4 Identificação dos indivíduos híbridos.....	43
3.2.1.5 Análises estatísticas	47
3.2.2 Análise da estrutura populacional e determinação do fluxo gênico entre populações de arroz vermelho	47
3.2.2.1 Material vegetal.....	47
3.2.2.2 Extração de DNA e amplificação dos marcadores SSR.....	48
3.2.2.3 Análise genética	50

	Página
3.2.2.4	Análise fenotípica da resistência aos herbicidas imidazolinonas 52
3.3	Adaptação de cultivares de arroz resistentes às imidazolinonas 53
3.3.1	Material vegetal 53
3.3.2	Primeiro experimento 54
3.3.3	Segundo experimento 55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
4.1	Origem da resistência de arroz vermelho às imidazolinonas 57
4.2	Quantificação do fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente e entre populações de arroz vermelho resistente do RS 72
4.2.1	Fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente 72
4.2.2	Fluxo gênico entre populações de arroz vermelho 93
4.3	Adaptação de cultivares de arroz resistentes às imidazolinonas 124
5	CONCLUSÕES GERAIS 145
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 147
7	APÊNCIDES 169
8	VITA 186

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Populações de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic coletados em diferentes locais do estado de RS na safra 2007/08.....	31
2. Marcadores <i>Single Sequence Repeats</i> utilizados na determinação da origem da resistência em acessos de arroz vermelho resistentes à imidazolinonas.	34
3. Marcador universal M13 e marcadores <i>Single Sequence Repeats</i> com respectivos iniciadores <i>forward</i> acrescidos com cauda M13 (sublinhada).....	34
4. Tamanho da amostra, em número de sementes, em função de três níveis de confiança (α) e três níveis de poder do teste. ¹	42
5. Plantas doadoras de pólen utilizadas no ensaio de fluxo gênico, respectivas mutações na enzima Acetolactato sintase (ALS) e marcadores SNP utilizados para identificação das mutações nos indivíduos híbridos.	46
6. Origem geográfica de 27 populações de arroz vermelho coletadas no RS. Porto Alegre, RS. 2010.	48
7. Composição dos painéis de 24 marcadores SSR utilizados na caracterização genética de populações de arroz vermelho do RS.	49
8. Genotipagem de cultivares de arroz, arroz vermelho e híbridos realizados em casa de vegetação, com quatro marcadores SSR. Porto Alegre, RS. 2010.	62
9. Frequências alélicas de acessos de arroz vermelho e cultivares de arroz, obtidas pela genotipagem de quatro marcadores SSR. Porto Alegre, RS. 2010.....	64
10. Origem da resistência de arroz vermelho resistente às imidazolinonas do RS. Porto Alegre, RS. 2010.	65
11. Razão entre número de indivíduos resistentes devido à seleção independente e fluxo gênico observados neste estudo e esperados em 1 ha a partir de dados da literatura. Porto Alegre, RS. 2010.	69

12. Análise de variância do fluxo gênico de cultivares de arroz e arroz vermelho resistentes à imidazolinonas para cultivar e arroz vermelho suscetíveis. As plantas suscetíveis foram receptoras de pólen e as resistentes foram doadoras. Análise realizada com base nos dados originais e com postos das observações ordenadas. Porto Alegre, RS. 2010.	77
13. Análise de variância heterocedástica de Welch para efeitos principais de receptor de pólen, doador de pólen, distância da fonte doadora e direção cardeal. Porto Alegre, RS. 2010.	78
14. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes à imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função das plantas receptoras. Porto Alegre, RS. 2010....	78
15. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes à imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função das plantas doadoras. Porto Alegre, RS. 2010.....	80
16. Fluxo gênico entre doadores de pólen resistentes a herbicidas imidazolinonas e receptores suscetíveis comparados pelo método dos mínimos quadrados ajustados pelo teste de Tukey.	82
17. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes à imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função da distância da fonte doadora de pólen. Porto Alegre, RS. 2010.....	84
18. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes à imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função das direções cardiais Porto Alegre, RS. 2010.	86
19. Medidas de diversidade em populações de arroz usando 24 marcadores SSR, baseadas em maior frequência alélica (MFA), número de alelos por <i>locus</i> (A), número de alelos por <i>locus</i> polimórfico (AP), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (f). Porto Alegre, RS. 2010.....	94
20. Medidas de diversidade em populações de arroz vermelho e cultivares de arroz baseada em número de alelos médio de alelos, proporção de <i>loci</i> polimórficos (P), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (f). Porto Alegre, RS. 2010.	95
21. Análise de variância molecular (AMOVA) das 27 populações de arroz vermelho baseada na análise de 24 marcadores SSR e fluxo gênico (Nm). Porto Alegre, RS. 2010.	97
22. Distância genética (Nei, 1983) entre 27 populações de arroz vermelho e 4 cultivares de arroz baseada em 24 SSR. Porto Alegre, RS. 2010.....	101

23. Proporção de associação de 27 populações de arroz vermelho e 4 cultivares de arroz em cada grupo (K) definido pelo *software* Structure. As cores entre parênteses são correspondentes com as apresentadas na Figura 20. Porto Alegre, RS. 2010. 111
24. Caracterização fenotípica de 27 populações de arroz vermelho quanto à resistência aos herbicidas imidazolinonas. Porto Alegre, RS. 2010..... 112
25. Duração do *lag phase* em sementes de cultivares arroz estimado pela germinação acumulada quando esta se torna diferente de zero. Porto Alegre, RS. 2010. 130
26. Parâmetros e intervalo de confiança da germinação acumulada à 20°C de sementes de lotes de cultivares de arroz, obtidos pelo ajuste do modelo logístico e taxa de germinação em b_l . Porto Alegre, RS. 2010. 133
27. Parâmetros e intervalo de confiança da germinação acumulada à 25°C de sementes de lotes de cultivares de arroz, obtidos pelo ajuste do modelo logístico e taxa de germinação em b_l . Porto Alegre, RS. 2010. 133
28. Parâmetros e intervalo de confiança da germinação acumulada de sementes de cultivares de arroz, obtidos pelo ajuste do modelo logístico e taxa de germinação em b_l em duas temperaturas. Porto Alegre, RS. 2010. 136

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Esquema hipotético dos oligonucleotídeos iniciadores e da amplificação de um fragmento SSR pelo método M13 *tail* PCR. A) oligonucleotídeo iniciador *forward* contendo a cauda M13 na extremidade 5'. B) oligonucleotídeo iniciador *reverse* não alterado. C) oligonucleotídeo iniciador universal M13 marcado com o fluoróforo 6-FAM. D) Primeira etapa da PCR. O iniciador *forward* com a cauda M13 é incorporado aos fragmentos de DNA. E) Segunda etapa da PCR. O iniciador M13 marcado com 6-FAM anela-se à cauda M13 dos fragmentos. F) os fragmentos finais contém o fluoróforo 6-FAM e podem ser analisados em sequenciador automático. Adaptado de Schuelke, 2000. 36
2. Esquema das épocas de semeadura das plantas doadoras - IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL, Sator CL e arroz vermelho resistente; e plantas receptoras - IRGA 417 e arroz vermelho suscetível. Cada época de semeadura foi realizada com intervalo de 10 dias. 40
3. 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. Cachoeirinha, RS. 2010. 41
4. Comprimento de raízes de cultivares de arroz e biótipos de arroz vermelho resistentes e suscetíveis à imazethapyr em função de concentrações crescentes do herbicida. Porto Alegre, RS. 2010. 44
5. 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 0,2 mM e posterior germinação em câmara de germinação a 25°C. Porto Alegre, RS. 2010. 45
6. Semente de arroz vermelho (esquerda) e arroz (direita) em processo de germinação. A germinação foi considerada quando a radícula alcançou 1 mm de comprimento. 55
7. Gel de agarose indicando os fragmentos resultantes da amplificação com três marcadores SSR em arroz cultivado e arroz vermelho. Lad, *Ladder* 100 pb (Invitrogen); 422, IRGA 422 CL; AVS, arroz vermelho suscetível; HIB, híbrido artificial obtido de cruzamento entre arroz cultivado IRGA 422 CL e arroz vermelho em casa de vegetação. Porto Alegre, RS. 2010. 58

8. Gel de agarose indicando os fragmentos resultantes da amplificação com cinco marcadores SSR em arroz cultivado e arroz vermelho. Lad, *Ladder* 100 pb (Invitrogen); 422, IRGA 422 CL; AVS, arroz vermelho suscetível; HIB, híbrido artificial obtido de cruzamento entre arroz cultivado IRGA 422 CL e arroz vermelho em casa de vegetação. Porto Alegre, RS. 2010. 59
9. Eletroferograma dos fragmentos do marcador RM341 amplificados de IRGA 422 CL (A), arroz vermelho (B) e híbrido artificial obtido em casa de vegetação, utilizando iniciador *foward* com cauda M13. Os picos vermelhos correspondem ao padrão ROX e os azuis correspondem aos alelos amplificados na PCR. Porto Alegre, RS. 2010. 61
10. Etapas da detecção dos híbridos entre arroz resistente a imidazolinonas e arroz suscetível. A) híbrido entre IRGA 417 e PUITÁ INTA CL. B) híbrido entre arroz vermelho suscetível e IRGA 422 CL. C) Detalhe comparativo entre sementes de IRGA 417 e híbridos resistentes. D) Detalhe comparativo entre arroz vermelho suscetível e híbridos resistentes. E) Estádio no qual as plantas híbridas foram aspergidas com o herbicida imazethapyr. Porto Alegre, RS. 2010. 74
11. Gel de agarose indicando os fragmentos SNP do arroz vermelho suscetível a imidazolinonas (AVS) utilizado como receptor de pólen, das cultivares IRGA 422 CL (422), PUITÁ INTA CL (PUI) e Sator CL (SAT) utilizadas como doadores de pólen e de indivíduos híbridos AVS x AVR (linhas 1, 2, 3 e 4), AVS x 422 (5, 6, 7 e 8), AVS x PUI (9, 10, 11 e 12) e AVS x SAT (13, 14, 15 e 16). LAD, *Ladder* 100 pb (Invitrogen). Acima, foi testada a presença da mutação Gly₆₅₄Glu de IRGA 422 CL e do arroz vermelho resistente. No centro, foi testada a presença da mutação Ala₁₂₂Thr de PUITÁ INTA CL. Abaixo, foi testada a mutação Ser₆₅₃Asp de Sator CL. Porto Alegre, RS. 2010. 75
12. Gel de agarose indicando os fragmentos SNP da cultivar IRGA 417 (417) utilizada como receptor de pólen, das cultivares IRGA 422 CL (422), PUITÁ INTA CL (PUI) e Sator CL (SAT) utilizadas como doadoras de pólen e de indivíduos híbridos 417 x AVR (linhas 1, 2, 3 e 4), 417 x 422 (5, 6, 7 e 8), 417 x PUI (9, 10, 11 e 12) e 417 x SAT (13, 14, 15 e 16). LAD, *Ladder* 100 pb (Invitrogen) Acima, foi testada a presença da mutação Gly₆₅₄Glu de IRGA 422 CL e do arroz vermelho resistente. No centro, foi testada a presença da mutação Ala₁₂₂Thr de PUITÁ INTA CL. Abaixo, foi testada a mutação Ser₆₅₃Asp de Sator CL. Porto Alegre, RS. 2010. 76
13. Fluxo gênico de entre plantas de arroz cultivado e arroz vermelho em função da distância da fonte doadora de pólen. Porto Alegre, RS. 2010. 85
14. Ventos predominantes na Estação Experimental do Arroz, no município de Cachoeirinha/RS, durante a o período de antese das plantas de arroz, expressos em número de dias de ocorrência. Cachoeirinha, RS. 2010. 86

15. Estação Experimental do Arroz - IRGA em Cachoeirinha/RS, circundada por árvores ao Norte, Oeste e Sul. A cidade situa-se à Leste. O círculo branco indica o local da área experimental. Imagem de satélite NOAA/US obtida no *software* Google Earth, 2010..... 88
16. Mapa do Rio Grande do Sul mostrando a distribuição das 27 populações de arroz vermelho coletadas na metade sul do Estado. A numeração corresponde ao nome dado às populações. 100
17. Agrupamento das populações de arroz vermelho e cultivares de arroz baseado nas distâncias genéticas de Nei (1983) pelo método UPGMA. Porto Alegre, RS. 2010. 103
18. Correlação entre distância genética de Nei (1983) e distância geográfica de 27 populações de arroz vermelho calculada pelo teste de Mantel. Porto Alegre, RS. 2010. 105
19. Análise de componentes principais de 27 populações de arroz vermelho e 4 cultivares de arroz usando 24 marcadores SSR e baseada na distância genética de Nei (1978). A seta preta indica a posição das cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL. As elipses indicam os três grupos definidos pela análise. Porto Alegre, RS. 2010. 108
20. Composição genética de 533 indivíduos de arroz vermelho e quatro cultivares de arroz do Rio Grande do Sul, agrupados em seis grupos (K=6), baseado em 24 marcadores SSR. As cores referentes a cada grupo são vermelho=K1, verde=K2, azul=K3, amarelo=K4, rosa=K5 e ciano=K6. Cada indivíduo é representado por uma coluna e as cores representam a contribuição de cada grupo K definido. Acima, os indivíduos estão ordenados por grupo de maior contribuição. Abaixo, a ordenação é baseada nas populações amostradas conforme numeração da Figura 16. As cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL foram localizadas no grupo K1 e Sator CL no grupo K2. A barra preta abaixo da figura indica as posições das cultivares na figura inferior. Porto Alegre, RS. 2010. 110
21. Germinação acumulada de quatro cultivares de arroz em função do tempo em três temperaturas. Porto Alegre, RS. 2010. 125
22. Germinação acumulada em função do tempo de cinco lotes de Sator CL a 20°C. Os círculos representam os dados observados, a linha contínua representa a variação estimada pela regressão logística e a linha tracejada representa a variação estimada pela regressão de Weibull. Porto Alegre, RS. 2010..... 126

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos alimentos mais importantes da dieta da população brasileira e de outros países do mundo. Este cereal, quando combinado com o feijão ou outras leguminosas, fornece equilibrada proporção de proteínas e carboidratos. O arroz é um dos alimentos mais consumidos no Brasil, independentemente do nível de renda. O Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz tendo alcançado uma produção de 11,2 milhões de toneladas na safra 2009/2010. Na Região Sul concentra-se a maior área orizícola do País, sobretudo no estado do Rio Grande do Sul (RS). O RS desponta como o maior produtor de arroz no Brasil, sendo responsável por mais de 60% da produção nacional.

O cultivo de arroz irrigado no Rio Grande do Sul tem como uma de suas principais limitações a competição com plantas daninhas, especialmente o arroz vermelho. Além de danos indiretos como desvalorização do produto, o arroz vermelho causa perdas no rendimento de grãos de arroz. Atualmente, mais da metade da área cultivada com arroz está infestada com arroz vermelho segundo levantamento do Instituto Rio Grandense do Arroz - IRGA. As principais estratégias comumente recomendadas para minimizar os efeitos da competição entre arroz e arroz vermelho são, principalmente, a rotação de culturas e o uso de sementes livres de arroz vermelho. Entretanto, estas práticas não são efetivas ou têm aplicação limitada diante da realidade do cultivo de arroz irrigado no RS. Ainda, o controle químico, que é efetivo em relação

a outras plantas daninhas na cultura do arroz, é impraticável devido à similaridade genética entre o arroz vermelho e o arroz cultivado.

Cultivares de arroz resistente a herbicidas do grupo químico imidazolinonas foram desenvolvidas por meio de mutações induzidas no gene da enzima acetolactato sintase (ALS). A utilização destas cultivares permite o controle de arroz vermelho e outras plantas daninhas com extrema eficiência através de herbicidas imidazolinonas, que originalmente não são seletivos para o arroz. A utilização de cultivares resistentes a imidazolinonas no RS alcançou 50% das áreas de cultivo de arroz na safra 2009/2010 totalizando mais de 510 mil hectares semeados. No entanto, o surgimento de biótipos de arroz vermelho resistentes a imidazolinonas tem se tornado um problema em todo o RS. Estimativas recentes indicam haver populações de arroz vermelho resistentes em todas as regiões orizícolas do RS, provocando prejuízos produtivos e econômicos.

A origem da resistência de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas pode estar relacionada a processos de evolução independente ou devido ao fluxo gênico de cultivares de arroz resistentes para biótipos de arroz vermelho. O fluxo gênico, por sua vez, pode ocorrer devido à fecundação cruzada entre plantas de arroz cultivado resistente a herbicidas imidazolinonas e arroz vermelho, ou por migração do alelo de resistência através da mobilização de sementes entre lavouras. Entretanto, não é conhecida qual a contribuição de cada processo de origem do arroz vermelho resistente a herbicidas que ocorre em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. Atualmente, devido à presença frequente de biótipos de arroz vermelho resistentes existe também a possibilidade de o fluxo gênico ocorrer a partir de plantas de arroz vermelho resistente, originadas independentemente, para populações de arroz vermelho suscetíveis. No entanto, esta possibilidade ainda não foi estudada em relação à sua ocorrência em lavouras de arroz irrigado do RS.

Além da problemática envolvendo a resistência às imidazolinonas, a presença de mutações no gene da ALS pode alterar a adaptação dos biótipos de arroz vermelho resistentes. Isso pode torná-los mais competitivos ou adaptados ao ambiente em comparação aos biótipos suscetíveis na ausência dos herbicidas. Este fato implicaria na substituição das populações suscetíveis menos adaptadas, por populações resistentes mais adaptadas, mesmo na ausência de aplicações de herbicidas imidazolinonas. Estudos anteriores envolvendo outras espécies de plantas resistentes a herbicidas inibidores da enzima ALS, incluindo imidazolinonas, mostraram que populações resistentes podem manifestar melhor adaptação através de germinação mais rápida em comparação com populações suscetíveis, sobretudo em condições de baixa temperatura. Esta informação é inexistente em relação ao arroz resistente às imidazolinonas.

Diante disso, há a necessidade de estudos que viabilizem as bases de conhecimento necessárias para o entendimento da evolução da resistência do arroz vermelho a herbicidas imidazolinonas nas áreas onde o cultivo é realizado com cultivares resistentes a estes herbicidas. Tais estudos devem enfatizar o esclarecimento da origem da resistência, a detecção de alterações adaptativas nos biótipos resistentes e, a introgressão dos alelos do gene da ALS insensível aos herbicidas imidazolinonas nas populações de arroz vermelho.

Objetivo geral

Identificar a origem da resistência aos herbicidas inibidores de enzima ALS em arroz vermelho, e seus possíveis efeitos na alteração da adaptação das populações resistentes a esses herbicidas.

Objetivos específicos

- i) Elucidar a proporção do fluxo gênico e da evolução independente como processos de origem da resistência de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas no RS;
- ii) Quantificar a hibridização a partir de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imidazolinonas para arroz vermelho suscetíveis, em condições de cultivo de arroz irrigado;
- iii) Avaliar a ocorrência de fluxo gênico entre populações de arroz vermelho do RS com base na investigação da variação e estruturação genética destas populações;
- iv) Identificar possíveis alterações na adaptação de populações de arroz resistente a herbicidas imidazolinonas com base no estudo do padrão da germinação de sementes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.)

Evidências arqueológicas indicam que o arroz já era cultivado na Ásia desde 8000 anos atrás, embora fitólitos de arroz tenham sido encontrados junto a vestígios humanos em sítios arqueológicos datando de 11 000 a.C. na China (Zhao, 1998; Sweeney & Mccouch, 2007). Além da China, países como Índia e Tailândia possuem registros milenares do cultivo do arroz. Posteriormente, o cultivo do arroz se espalhou para os demais continentes (Harlan, 1975).

Atualmente, o arroz é produzido em mais de 110 países, sendo a fonte básica de alimentação de mais de 50% dos habitantes no mundo (FAO, 2009). De acordo com a Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO), o arroz é o 3º alimento mais produzido no mundo, sendo que a produção alcançada em 2010 foi de 670 milhões de toneladas, 1% acima da produção do ano anterior. Porém, os estoques dessa *commodity* decresceram 50% nos últimos 10 anos refletindo um aumento proporcional maior no consumo em relação à produção (FAO, 2010).

O Brasil é o nono maior produtor de arroz do mundo e é responsável por 2% da produção mundial (FAO, 2010). O consumo per capita de arroz em casca no Brasil é de 67 kg/ano, resultando na necessidade de 13 milhões toneladas/ano para abastecer o mercado interno. Com uma produtividade média de 4000 kg/ha, a produção total de

arroz no País na safra 2009/2010 foi de aproximadamente 11,2 milhões toneladas de grãos, em uma área plantada de 2,7 milhões de hectares (CONAB, 2010). O Rio Grande do Sul é responsável por aproximadamente 60% da produção nacional e, considerando somente arroz irrigado este valor chega a 80%. No entanto, a área de cultivo de arroz no RS representa apenas um terço do total do Brasil.

A produtividade de arroz no Rio Grande do Sul tem aumentado ao longo dos anos. Na década de 70 a produtividade média foi em torno de 3500 kg/ha, enquanto na década de 90 esse valor aumentou para 4500 kg/ha. No final dos anos 2000, foi alcançado o patamar de 7000 kg/ha. Em 2010, a produtividade média de arroz no RS foi de pouco mais de 6400 kg/ha (CONAB, 2010; IRGA 2010). Além da importância produtiva, o arroz gaúcho destaca-se ainda pela qualidade. O Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (2010) concedeu, em agosto de 2010, a primeira denominação de origem do Brasil ao arroz produzido no “Litoral Norte Gaúcho”, o que representa um avanço em termos econômicos, mercadológicos e sociais na produção de arroz no RS.

Embora avanços significativos tenham ocorrido na produtividade de arroz no RS, esta ainda é grandemente limitada por fatores como semeadura fora da época recomendada, ataque de patógenos e pragas, uso de sementes não certificadas, e principalmente devido à competição da cultura com plantas daninhas. Dentre as plantas daninhas, o arroz vermelho é um dos principais limitantes ao alcance do potencial produtivo das cultivares de arroz Brasil (Agostinetto *et al.*, 2001).

2.2 Arroz vermelho (*Oryza sativa* L.)

O arroz vermelho possui diversas nomenclaturas em diferentes regiões do mundo e é classificado como *Oryza sativa* L. (Sánchez-Olquín *et al.*, 2007), ou seja,

pertence à mesma espécie que o arroz cultivado. Um estudo de caracterização genética mostrou que diversos biótipos de arroz vermelho dos EUA eram geneticamente distantes de *O. sativa ssp indica*, e que sua origem está relacionada à espécie cultivada *O. sativa ssp japonica* e as espécies silvestres *O. nivara* e *O. rufipogon* (Vaughan *et al.*, 2001). Entretanto, estudos recentes confirmaram que a origem do arroz vermelho nos EUA é relacionada principalmente à *O. sativa ssp japonica* e não às espécies silvestres anteriormente descritas (Olsen *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2010; Reagon *et al.*, 2010). No Brasil, as infestações com arroz vermelho são exclusivamente compostas por plantas da espécie *O. sativa* L.

O nome arroz vermelho é derivado da cor vermelha do pericarpo das sementes (Gross *et al.*, 2010). O pericarpo vermelho é uma característica indesejada pelo consumidor de arroz e por isso interfere no seu beneficiamento e comercialização (Balbinot Jr *et al.*, 2003). Os grãos de arroz vermelho têm forma arredondada com ranhuras longitudinais, contrastando com o formato cilíndrico liso dos grãos comerciais (Hamid *et al.*, 2007). No entanto, a seleção imposta por determinadas práticas de cultivo e a fecundação cruzada entre as cultivares de arroz e o arroz vermelho têm resultado na diminuição desta característica entre o arroz vermelho e o arroz cultivado (Menezes *et al.*, 2002).

O arroz vermelho apresenta em geral maior afilamento quando comparado às cultivares de arroz o que lhe proporciona alta competitividade (Menezes *et al.*, 2002; Schwanke *et al.*, 2008). Além disso, plantas de arroz vermelho têm porte mais alto que as plantas de arroz cultivadas e o colmo com coloração levemente avermelhado (Sánchez-Olquín *et al.*, 2007). Associado ao alto perfilamento, a maior estatura do arroz vermelho provê alta competitividade por luz em relação às cultivares de arroz (Fleck *et al.*, 2008). Uma planta de arroz vermelho pode produzir mais de 2000

sementes em um ciclo de florescimento (Hamid *et al.*, 2007). Além disso, o arroz vermelho apresenta alto nível de degrane em suas sementes, que caem ao solo durante o estágio de maturação fisiológica (Schwanke *et al.*, 2008). Ainda, as sementes de arroz vermelho apresentam altos níveis de dormência (Noldin *et al.*, 1999; Sweeney & Mccouch, 2007), permanecendo viáveis sob o solo por até 10 anos (Noldin *et al.*, 2006).

Entre os caracteres que definem o comportamento competitivo do arroz vermelho na cultura do arroz, os mais importantes são o degrane e a dormência. O degrane impede que as sementes sejam colhidas, fazendo com que elas cheguem até o solo e se acumulem no banco de sementes. A dormência, por sua vez, garante a persistência do arroz vermelho ao longo do tempo (Gu *et al.*, 2006), reduzindo a eficiência das práticas de controle pela recolonização das áreas infestadas.

Em meados da década de 90, a área de cultivo de arroz infestada com arroz vermelho no RS era de 27% (Souza, 2001). Pouco mais de dez anos depois, a infestação aumentou para aproximadamente 56% e está presente em todas as regiões de cultivo de arroz do RS, numa densidade variando entre 5 a 30 plantas/m² (IRGA, 2010). No Brasil não há uma estimativa econômica de prejuízos causados pelo arroz vermelho. Contudo, estima-se que no sul dos EUA tais prejuízos sejam da ordem de US\$ 300,00/ha (Burgos *et al.*, 2008). Considerada a infestante de mais difícil manejo na lavoura do arroz irrigado, o arroz vermelho causa perdas médias no rendimento de grãos em torno de 20%, e se nenhuma medida de controle for empregada este valor chega a 90% em áreas altamente infestadas (Diarra *et al.*, 1985; Avila *et al.*, 2005). Essa redução no rendimento deve-se à maior capacidade de competição do arroz vermelho influenciando negativamente no arroz cultivado em diversas etapas do desenvolvimento. Como exemplo, foi mostrado que o arroz vermelho, em relação ao arroz cultivado, apresenta

crescimento e desenvolvimento mais acelerados, maior perfilhamento, maior produção de biomassa e maior índice de área foliar além de germinação mais precoce (Fleck *et al.*, 2008). Além de perdas diretas causadas pela competição com o arroz cultivado, o arroz vermelho causa perdas indiretas, como a depreciação do valor das terras infestadas e do preço de venda do arroz colhido contaminado com sementes da daninha (Balbinot Jr *et al.*, 2003). A presença de sementes de arroz vermelho aumenta os custos de limpeza e polimento além de limitar a classificação comercial do arroz beneficiado (MAPA, 2010).

Diversas práticas de manejo têm sido adotadas como tentativas de mitigar os efeitos negativos da competição do arroz vermelho com o arroz cultivado. Estas práticas referem-se à rotação de culturas, preparo do solo em sistemas de cultivo mínimo, plantio direto e sistema pré-geminado, utilização de sementes de arroz certificadas e livres de arroz vermelho, semeadura na época recomendada e controle biológico com carpas ou marrecos (Agostinetto *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2007; Verneti Junior *et al.*, 2009). Entretanto, estas práticas não são efetivas ou têm aplicação limitada. Por exemplo, a rotação da cultura do arroz com soja é uma opção aplicável, pois esta é mais hábil que o arroz vermelho em captar nutrientes e luz em condições de campo (Moraes *et al.*, 2009), e proporciona a utilização de herbicidas para o controle desta planta daninha. Entretanto, o cultivo de arroz ocorre principalmente em solos hidromórficos, o que limita a realização da rotação de culturas a poucas áreas com sistema de drenagem eficiente (Griffin & Harger, 1990; Mussgnug *et al.*, 2006). Ainda, o controle químico com herbicidas seletivos, que é efetivo em relação a outras plantas daninhas na cultura do arroz, era limitado devido à similaridade genética entre o arroz vermelho e o arroz cultivado. O controle químico do arroz vermelho era realizado com herbicidas pré-emergentes, o que requeria a retirada da água da lavoura antes da

semeadura do arroz (Eleftherohorinos & Dhima, 2002). Alternativamente, em locais altamente infestados, o controle era realizado com herbicidas de ação total em plantas germinadas após revolvimentos do solo (Eleftherohorinos & Dhima, 2002; Rodenburg & Demont, 2009). Entretanto, estas práticas são onerosas e pouco eficientes. Posteriormente, o desenvolvimento de cultivares de arroz resistentes a herbicidas do grupo químico das imidazolinonas possibilitou o controle de arroz vermelho seletivamente à cultura do arroz através da utilização destes herbicidas (Steele *et al.*, 2002).

2.3 Cultivares de arroz e arroz vermelho resistentes às imidazolinonas

Em meados da década de 90, um processo de mutagênese induzida por etil-metanossulfonato seguido de seleção com os herbicidas do grupo das imidazolinonas imazethapyr e imazapic em sementes de arroz produziu plantas de arroz resistente a estes herbicidas, dando origem à linhagem de arroz resistente 93-AS-3510 (Croughan, 1998).

Diversas cultivares resistentes à imidazolinonas foram desenvolvidas usando a linhagem 93-AS-3510 como genitor. Nos EUA foram comercializadas as cultivares CL 121 e CL 141 em 2001 tendo grande aceitação pelos produtores que passaram a utilizá-las como principal forma de controlar o arroz vermelho (Webster & Masson, 2001; Gealy *et al.*, 2003). As mesmas técnicas de mutagênese e seleção foram empregadas sobre a cultivar de arroz *Cypress*, originando a linhagem PWC16 (Wenefrida *et al.*, 2004). Esta linhagem foi utilizada para desenvolvimento da cultivar CL 161, comercializada pela primeira vez, nos EUA em 2003 (Tan *et al.*, 2005). Na Argentina, a cultivar PUITÁ INTA CL foi obtida igualmente por mutagênese e seleção das linhas resistentes às imidazolinonas a partir da

cultivar IRGA 417 (Livore *et al.*, 2007). As mutações na enzima ALS responsáveis pela resistência à imidazolinonas na linhagem 93-AS-3510 é Gly₆₅₄Glu (Croughan, 1998), na linhagem PWC16 é Ser₆₅₃Asn e na cultivar PUITÁ INTA CL é Ala₁₂₂Thr (Roso *et al.*, 2010a).

No Brasil, a cultivar IRGA 422 CL foi comercializada inicialmente em 2003. Esta cultivar foi desenvolvida através do método de retrocruzamento, no qual a linhagem mutante 93-AS-3510 foi utilizada como fonte doadora do gene de resistência ao herbicida imazethapyr e a cultivar IRGA 417 como o genitor recorrente. O cruzamento inicial foi realizado no ano de 1996 em Louisiana, nos EUA. As demais etapas foram realizadas na Estação Experimental do Arroz (EEA) do IRGA, em Cachoeirinha/RS (IRGA, 2010). Foram realizadas cinco gerações de retrocruzamentos e três de autofecundações além de testes de seletividade utilizando o herbicida imazethapyr como agente seletivo (IRGA, 2010). Segundo a SOSBAI (2010), as cultivares resistentes a herbicidas imidazolinonas disponíveis comercialmente no Brasil atualmente são IRGA 422 CL, BRS Sinuelo CL, SCS 115 CL, estas originadas linhagem 93-AS35-10; Sator CL, Avaxi CL, Apsa CL e Inov CL originadas a partir da linhagem PWC16; e a cultivar PUITÁ INTA CL, originada diretamente por mutação a partir de IRGA 417.

Os herbicidas do grupo químico imidazolinonas atuam na inibição da ALS (acetolactato sintase ou *aceto-hidroxiácido sintase*, *E.C.4.1.3.18*), que é uma enzima participante da biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina em plantas (Mccourt & Duggleby, 2006). Estes aminoácidos são sintetizados exclusivamente por plantas e microorganismos a partir de piruvato para valina, piruvato e acetil CoA para leucina, e piruvato e cetobutirato para isoleucina (Duggleby *et al.*, 2008). Na primeira etapa na rota de síntese destes aminoácidos ocorre a formação de 2-acetolactato ou

2-aceto-2-hidroxitirato, ambas as reações catalisadas pela ALS. Além do grupo das imidazolinonas, outros quatro grupos químicos compõem os herbicidas inibidores da ALS que são sulfoniluréias, pirimidiniltio-benzoatos, triazolpirimidinas e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (Mccourt & Duggleby, 2006).

O imazethapyr foi o primeiro herbicida indicado para utilização em cultivares de arroz resistentes a imidazolinonas (Masson & Webster, 2001). No Brasil, a associação de herbicidas imazethapyr + imazapic foi introduzida junto a cultivar IRGA 422 CL para controle do arroz vermelho e outras espécies de plantas daninhas na cultura do arroz. Atualmente além da associação imazethapyr + imazapic, a associação de imazapyr + imazapic também é recomendada para utilização em cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas (SOSBAI, 2010).

Avaliações iniciais mostraram que a aplicação imazethapyr + imazapic nas doses recomendadas proporcionou 100% de controle do arroz vermelho (Santos *et al.*, 2007). No entanto, o uso continuado destes herbicidas exerce uma alta pressão de seleção sobre biótipos de arroz vermelho e de outras plantas daninhas, contribuindo para surgimento de populações resistentes. Existem no mundo 97 espécies de plantas daninhas resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase e sua seleção é relativamente rápida, surgindo em torno de quatro anos após a utilização destes herbicidas (Preston & Powles, 2002). Além disso, a possibilidade de ocorrência de hibridização 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 aos inibidores de ALS no arroz vermelho, impossibilitando seu controle.

Vários biótipos de arroz vermelho resistente aos inibidores de ALS foram identificados nas lavouras de arroz irrigado dos EUA (Rajguru *et al.*, 2005) e do Brasil (Menezes *et al.*, 2009). Entre 130 indivíduos provenientes de 26 lavouras nos EUA, em

pelo menos três a resistência foi causada seleção independentemente da ocorrência de fluxo gênico (Kuk *et al.*, 2008). Esta informação ainda não é disponível no Brasil, e é de fundamental importância para a determinação do foco principal de práticas de manejo relacionadas à prevenção da evolução da resistência de plantas resistentes a herbicidas. Em um recente trabalho, Menezes *et al.* (2009) investigaram 228 populações de arroz vermelho do RS e identificaram 128 populações resistentes à imazethapyr+imazapic, o que representou 56% das populações avaliadas. O fator de resistência encontrado nestas populações variou de 5,2 a 11,6, indicando haver populações de arroz vermelho altamente resistentes aos herbicidas testados. Trabalhando com as mesmas populações, Roso *et al.* (2010a) identificaram que o mecanismo de resistência predominante nestas populações foi local de ação alterado. Neste estudo percebeu-se que as mutações presentes nos genes da ALS dos mesmos biótipos de arroz vermelho resistentes foram, em sua maioria, iguais aos das cultivares de arroz resistente IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL. Neste trabalho foi identificado que aproximadamente 13% das 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, que foi a cultivar resistente mais utilizada pelos orizicultores no RS até 2008. Estes resultados são indícios da ocorrência de fluxo gênico entre cultivares de arroz resistentes a herbicidas e arroz vermelho nas condições de cultivo do RS.

2.4 Fluxo gênico

Uma das principais fontes de variabilidade genética das espécies de plantas e animais incluindo seres humanos é o fluxo gênico que, associado à seleção natural e deriva genética mantém as populações em constante evolução (Harlan, 1975). 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). Apesar da grande importância do fluxo gênico no processo evolutivo, na esfera agrônômica este processo tem se caracterizado como limitante na biossegurança (Jun *et al.*, 2010; Rong *et al.*, 2010) e de manutenção das fontes de variabilidade genética, tão importante para os programas de melhoramento (Slarkin, 1985; Duputie *et al.*, 2007). Nos locais onde as culturas são cultivadas geograficamente próximas a espécies silvestres correlatas, o fluxo gênico na direção cultivada-silvestre pode reduzir-lhes a variabilidade ou mesmo incrementar o comportamento invasivo das populações silvestres (Ellstrand, 2009). Nesse sentido, os diversos cenários onde o fluxo gênico de culturas comerciais para suas respectivas espécies correlatas têm sido estudados como sorgo e *Sorghum bicolor* (Sahoo *et al.*, 2010), canola e *Brassica juncea* (Huangfu *et al.*, 2011), mandioca e *Manihot sp.* (Duputie *et al.*, 2007), rabanete e *Raphanus raphanistrum* (Snow *et al.*, 2010) e arroz e arroz vermelho (Shivrain *et al.*, 2009b). O caso do arroz é um dos mais importantes devido à importância desta cultura e ao número espécies capazes de hibridizar com as cultivares comerciais. As espécies *O. glaberrima*, *O. meridionalis*, *O. rufipogon*, *O. glumaepatula*, *O. nivara*, *O. longistaminata* possuem o genoma AA que é o mesmo encontrado em *O. sativa* (Vaughan, 1989; Kuroda *et al.*, 2007). Dessa forma, hibridizações podem ocorrer entre estas espécies (Lu & Yang, 2009).

O sistema de fecundação do arroz é a autogamia, embora diversos estudos tenham mostrado valores entre 0,01 a 52% de polinização cruzada dependendo das condições ambientais e de cultivo, das características inerentes às cultivares e biótipos, da época de florescimento e da distância entre as plantas (Langevin *et al.*, 1990; Gealy *et al.*, 2003; Shivrain *et al.*, 2009a). Mesmo apresentando,

em geral, uma baixa taxa de alogamia ou fluxo gênico, esta pode ser bastante expressiva devido ao grande número de plantas presentes nas áreas de cultivo. Como consequência, tem-se a evolução das populações de arroz vermelho que adquirem características das cultivares utilizadas. Ainda, a manifestação do vigor híbrido torna as gerações subsequentes mais competitivas (Noldin *et al.*, 2004; Shivrain *et al.*, 2009a), resultando em maiores prejuízos econômicos na atividade orizícola. Além disso, o controle de populações de arroz vermelho resistentes com herbicidas seletivos ao arroz se torna limitado (Menezes *et al.*, 2009).

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para identificação do fluxo gênico em arroz, entre estas se destacam o uso de marcadores moleculares e bioensaios de embebição de sementes. Por exemplo, 25 marcadores moleculares microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) foram utilizados para identificar 16 híbridos de arroz cultivado e arroz vermelho (Gealy *et al.*, 2002). Recentemente, apenas dois marcadores SSR foram usados na identificação de híbridos de arroz resistente a imidazolinonas e arroz vermelho (Shivrain *et al.*, 2009b). Marcadores SSR são largamente utilizados em estudos evolutivos e de genética de populações devido ao seu alto grau informativo, que permite detectar polimorfismo molecular com grande eficácia, além de ter custo relativamente baixo em comparação a outros métodos. Atualmente estão disponíveis mais de 72 000 marcadores SSR para o arroz (Zhang *et al.*, 2007; Parida *et al.*, 2009) que facilita a realização de estudos genéticos no gênero *Oryza* de forma geral, pois a maioria destes marcadores são polimórficos entre espécies deste gênero.

Os bioensaios de embebição de sementes também vêm sendo utilizados na detecção de indivíduos resistentes aos herbicidas em várias espécies, e são prontamente aplicável na identificação de fluxo gênico entre arroz resistente a imidazolinonas e arroz vermelho. Este método consiste na embebição de sementes em solução herbicida por

24h e posterior germinação em câmara de germinação (Roso *et al.*, 2010b). Os indivíduos resistentes e suscetíveis são discriminados facilmente através do comprimento diferencial das raízes. A resistência de arroz vermelho às imidazolinonas tem sido identificada com este método (Kuk *et al.*, 2008; Shivrain *et al.*, 2010b). Ainda, o fluxo gênico entre plantas suscetíveis e resistentes a herbicidas tem sido detectado com este método com outros herbicidas e outras espécies de plantas daninhas (Noldin *et al.*, 2002; Rong *et al.*, 2005; Merotto Jr *et al.*, 2009).

O fluxo gênico tem sido estudado em condições controladas e de campo, sobretudo envolvendo cultivares resistentes e suscetíveis a herbicidas, além de populações de arroz vermelho (Gealy *et al.*, 2003). De fato, o fluxo gênico entre cultivares de arroz resistentes a glufosinato de amônio e cultivares suscetíveis foram identificados em vários trabalhos (Messeguer *et al.*, 2001; Noldin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Messeguer *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2008; Kanya *et al.*, 2009). Além disso, também foi avaliado o fluxo gênico destas cultivares resistentes para biótipos de arroz vermelho (Noldin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Messeguer *et al.*, 2004; Sanchez Olguin *et al.*, 2009). Do mesmo modo, cultivares de arroz resistentes a herbicidas do grupo das imidazolinonas também apresentaram fluxo gênico tanto para cultivares suscetíveis como para biótipos de arroz vermelho em diversos estudos (Gealy *et al.*, 2003; Shivrain *et al.*, 2007; Kadaru *et al.*, 2008; Shivrain *et al.*, 2009a). No Brasil, foi identificado fluxo gênico a partir de cultivares resistentes e suscetíveis a herbicidas para biótipos de arroz vermelho (Noldin *et al.*, 2002; Gealy *et al.*, 2003; Villa *et al.*, 2006; Brunet *et al.*, 2007). Além do fluxo gênico entre arroz cultivado e arroz vermelho, este também foi identificado entre arroz cultivado e outras espécies do gênero *Oryza* (Song *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2008; Niruntrayakul *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009). Ainda, outras características têm sido

estudadas na cultura do arroz em função do fluxo gênico como a tolerância a lepidópteros (Rong *et al.*, 2005; Rong *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2009) e coloração de grãos (Endo *et al.*, 2009).

Embora estudos tenham mostrado a ocorrência de fluxo gênico a partir de cultivares de arroz para arroz vermelho (Shivrain *et al.*, 2008) ou mesmo a ocorrência de biótipos de arroz vermelho resistentes a imidazolinonas (Sales *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2009), pouco se sabe sobre a ocorrência de fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente. Em um trabalho realizado nos EUA foi detectado fluxo gênico de arroz vermelho para cultivares de arroz (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, pois uma vez que plantas de arroz vermelho tornem-se resistentes, estas passam a ser fonte do gene que causa resistência. Isto permite a introgressão desse gene nas demais populações de arroz em outras áreas de cultivo. Além disso, a distribuição da resistência também pode ocorrer por fluxo gênico entre lavouras. Neste caso, sementes, ou eventualmente, pólen podem ser transportados da uma área para outra de forma a introduzir o alelo de resistência em novas populações (Gealy *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004).

Assim sendo, a ocorrência do fluxo gênico de resistência a herbicidas a partir de uma cultivar de arroz resistente para a planta daninha arroz vermelho possui três dimensões. Primeiro, o fluxo pode acontecer diretamente da cultivar de arroz para o arroz vermelho. Segundo, o fluxo gênico em uma determinada lavoura pode ocorrer a

partir de uma planta de arroz vermelho já resistente originada por um processo independente de mutação no gene da enzima alvo de um herbicida. Terceiro, a origem da resistência pode estar relacionada à migração do gene de resistência entre lavouras devido à mobilização de principalmente sementes, mas também de pólen, de arroz vermelho já resistente aos herbicidas.

A determinação da predominância e da magnitude destes processos é importante para indicar a necessidade de intensificação de estratégias de prevenção e manejo da resistência do arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas. Baseado nisso, se a resistência aos herbicidas em arroz vermelho for devida principalmente processos independentes de seleção de mutantes, o manejo poderia ser realizado com base na redução da pressão de seleção pelos herbicidas. No caso do arroz, isso é alcançado através da rotação de culturas que permite a utilização de herbicidas de distintos mecanismos de ação (Burgos *et al.*, 2008). Por outro lado, se a resistência for devida ao fluxo gênico de arroz vermelho resistente para outras áreas orizícolas, o manejo da resistência deve ter como base a utilização de sementes certificadas, livres de arroz vermelho e limpeza de maquinário compartilhado ou alugado. Por fim, se a resistência de arroz vermelho provir fundamentalmente de fluxo direto de cultivares resistentes aos herbicidas, as estratégias de controle deverão basear-se no controle de escapes de arroz vermelho. Para tanto, práticas como *rouging* ou catação manual, aplicação sequencial de herbicidas e aplicação de herbicidas durante o florescimento do arroz vermelho podem ser utilizadas (Agostinetto *et al.*, 2001).

Ainda, o conhecimento de possíveis alterações adaptativas nas plantas resistentes, independente da origem da resistência, auxilia na determinação de métodos de manejo que, baseados nestas alterações, sejam mais efetivos no controle de populações de arroz vermelho resistentes.

2.5 Alteração na adaptação de plantas resistentes a herbicidas

Adaptação ou *fitness* refere-se à capacidade de uma população em ocupar um dado local em certas condições ambientais através da sobrevivência e reprodução e, em se tratando de lavouras, são abrangidos os efeitos das condições de cultivo (Orr, 2005). As alterações nesse processo são devidas a pequenas mudanças em certas características dos organismos, através de mutações ou fluxo gênico, que podem causar tanto ganho quanto perda da adaptação. Como resultado ocorre a troca de populações menos adaptadas por outras melhor adaptadas (Snow *et al.*, 2010). O fluxo gênico de características distintas de cultivares promove diferentes alterações na adaptação de híbridos de espécies cultivadas e silvestres (Kumar *et al.*, 2008). Este fato implica diretamente na cultura do arroz, uma vez que espécies silvestres são fontes de germoplasma para programas de melhoramento (Rangel *et al.*, 2008). Contudo, hibridização e fluxo gênico são fontes de variabilidade e adaptação em ambientes naturais, tendo um papel importante na evolução das plantas, promovendo também alterações nos ecossistemas (Ellstrand *et al.*, 1999).

As alterações da adaptação de plantas advindas de hibridização entre variedades cultivadas e tipos silvestres correlatos tem se caracterizado como um assunto controverso (Arriola & Ellstrand, 1997; Snow *et al.*, 2001; Vila-Aiub *et al.*, 2009b; Mercer & Perales, 2010). A ausência de alteração da adaptação tem sido encontrada em relação ao fluxo gênico envolvendo resistência a herbicidas inibidores da ALS (Sibony & Rubin, 2003). Entretanto, muitos destes resultados são contestáveis por não serem realizados com avaliações durante todo o ciclo da planta, em competição com outra planta, utilizando linhas isogênicas ou um maior número de populações e, ainda, devido a problemas de genes ligados envolvidos no fluxo gênico entre plantas (Vila-

Aiub *et al.*, 2009b). Em muitos dos estudos sobre adaptação de indivíduos resistentes a herbicidas, são realizadas simples comparações de características morfológicas de poucos indivíduos resistentes e suscetíveis a certo herbicida (Christoffoleti *et al.*, 1997; Crooks *et al.*, 2005). Outros estudos têm revelado adaptação negativa ou ausência de alteração nas populações resistentes a herbicidas inibidores de acetilcoenzima A carboxilase (ACCase) (Vila-Aiub *et al.*, 2009a), ALS (Sibony & Rubin, 2003) e do fotossistema II (Nader *et al.*, 2008).

A inconsistência encontrada entre os diversos trabalhos relacionada à adaptação de populações resistentes a herbicidas pode ser atribuída à variação nos fatores que afetam esta característica. Além de variações devidas ao ambiente e à espécie estudada, outros fatores podem ter importância subestimada. Por exemplo, distintos mecanismos de resistência a herbicidas podem definir diferentes respostas adaptativas nos biótipos resistentes (Vila-Aiub *et al.*, 2005a). Park *et al.* (2004) encontraram adaptação positiva em biótipos de *Bromus tectorum* resistentes por local de ação alterado. Entretanto, Vila-Aiub *et al.* (2009a) mostraram que biótipos de *Lolium rigidum* resistentes a herbicidas por metabolização apresentam adaptação negativa. Além disso, casos de resistência múltipla onde um dos mecanismos é metabolização, também apresentaram penalidade na adaptação em biótipos resistentes aos herbicidas (Sibony & Rubin, 2003; Park & Mallory-Smith, 2005). Ainda, as enzimas alvo referentes aos mecanismos de ação dos herbicidas, ao sofrerem mutações podem promover diferentes implicações na adaptação. Um exemplo clássico deste processo ocorreu em plantas resistentes aos herbicidas inibidores do Fotossistema II devido à uma mutação na proteína D1 que é fundamental no processo fotossintético. A ocorrência de mutação nesta proteína além de causar a resistência de *Amaranthus tuberculatus* var. *rudis* a herbicidas triazinas, foi

relacionada a uma intensa adaptação negativa, resultando em menor produção de biomassa e de sementes (Nader *et al.*, 2008).

Mutações na enzima ALS, além da resistência a estes herbicidas em *Kochia scoparia* (Dyer *et al.*, 1993) e *Lactuca serriola* (Preston *et al.*, 2006), provocaram uma diminuição da autorregulação da rota pelos aminoácidos Valina, Leucina e Isoleucina. Isto já havia sido proposto por Singh *et al.* (1992) que trabalharam com o gene ALS de *Arabidopsis thaliana* em plasmídeos, cuja enzima sintetizada teve limitada autorregulação pelos aminoácidos. Esta insensibilidade à regulação faz com que a enzima ALS catalise as reações constantemente, resultando em biossíntese excessiva e consequente acúmulo dos mesmos nas sementes produzidas pelas plantas, dando-lhes maior velocidade germinativa (Dyer *et al.*, 1993). No entanto, a alteração na regulação da ALS parece estar relacionada com a mutação encontrada no gene da enzima. A mutação Pro₁₉₇His provocou insensibilidade da enzima ALS à regulação (Eberlein *et al.*, 1997), contudo a mutação Trp₅₅₇Leu não causou o mesmo efeito (Hattori *et al.*, 1995). Estudando o efeito de diferentes mutações que conferem resistência a herbicidas inibidores de ACCase em *Alopecurus myosuroides*, Menchari *et al.* (2008) mostraram que as mutações Ile₁₇₈₁Leu e Ile₂₀₄₁Asn não causaram alteração na adaptação nas populações, enquanto que a mutação Asp₂₀₇₁Gly causou diminuição da produção de biomassa, na produção e peso de sementes. Enfatiza-se, portanto, a necessidade de estudos que diferenciem caso a caso as respostas de adaptação em função da espécie e ambiente, natureza da enzima-alvo e sua importância fisiológica e dos mecanismos de resistência.

A resistência a inibidores de ALS em arroz vermelho pode ter outros efeitos além da perda de eficiência de controle. Um destes efeitos seria uma alteração no padrão de germinação de biótipos resistentes. Estudos realizados em biótipos de

Lactuca serriola indicaram que o biótipo resistente aos herbicidas do grupo químico sulfoniluréias, inibidores de ALS, germinaram mais rápido que os biótipos suscetíveis (Alcocer-Ruthling *et al.*, 1992). Resultados semelhantes foram encontrados em biótipos de *Kochia scoparia*, mas foi observado dependência da temperatura na germinação, havendo mais rápida germinação do biótipo resistente quando em baixa temperatura (Thompson *et al.*, 1994). Além disso, Park *et al.* (2004) mostraram que biótipos de *Bromus tectorum* resistentes a herbicidas do mesmo grupo químico produziram 80% mais sementes que os suscetíveis, além de suas sementes germinarem 24h antes e com maior intensidade. Um estudo mostrou que o nível da resistência a imidazolinonas em arroz vermelho é dependente da mutação presente no gene da ALS (Sales *et al.*, 2008). Embora não tenha sido avaliada nesse estudo, a atividade da enzima ALS também poderia estar relacionada com as mutações. A cultivar de arroz resistente às imidazolinonas PUITÁ INTA CL germinou mais rápido que cultivar suscetível IRGA 417 em temperaturas amenas (Merotto Jr *et al.*, 2007). Este estudo caracterizou a diferença de velocidade de germinação nas cultivares avaliadas em apenas um lote de sementes. Entretanto, estes efeitos podem estar relacionados tanto às características inerentes aos genótipos ou ao efeito ambiental dos locais onde as sementes foram produzidas. Para isolar tais efeitos, sementes de diversos locais de produção devem ser avaliadas de forma a isolar os efeitos genotípicos e ambientais desse fenômeno.

Duas consequências podem resultar da germinação mais rápida em condições de baixas temperaturas de um biótipo de arroz vermelho. Primeiramente, biótipos resistentes podem tornar-se competitivamente dominantes devido a sua rápida emergência. Alternativamente, a germinação mais rápida do biótipo resistente permite prematura eliminação pelo preparo de solo ou por práticas de controle de plantas daninhas anteriormente a sementeira da cultura. As alterações na adaptação de arroz

vermelho resistente a inibidores de ALS será dependente ainda, da constituição genética que cada população apresenta. Por isso, estudos genéticos envolvendo estas populações permitem entender como as populações resistentes e suscetíveis de arroz vermelho irão evoluir e adaptar-se diferencialmente neste novo cenário.

2.6 Diversidade genética de populações de *Oryza sativa* L.

A diversidade genética é a expressão utilizada para descrever as variações genéticas herdáveis encontradas entre e dentro de espécies, populações de uma espécie, ou indivíduos de uma população (Hughes *et al.*, 2008). Estudos genéticos em arroz têm elucidado aspectos importantes do gênero *Oryza*, que contém duas espécies cultivadas e aproximadamente 20 espécies silvestres distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Américas Central e do Sul, na África, Oceania e Ásia (Sundaramoorthi *et al.*, 2009; Kumagai *et al.*, 2010; Roulin *et al.*, 2010).

O complexo *O. sativa* é o mais importante grupo com respeito à estudos de evolução de plantas cultivadas, consistindo de duas espécies principais, a asiática *O. sativa* e a africana *O. glaberrima*, e ainda cinco espécies silvestres (Kumagai *et al.*, 2010). Dentro da espécie cultivada *O. sativa*, existem duas subespécies, *japonica* e *indica*. Diversos estudos sugerem que estas subespécies são produtos de eventos distintos de domesticação a partir do ancestral *O. rufipogon* (Cheng *et al.*, 2003; Zhu & Ge, 2005; Londo *et al.*, 2006). Esta hipótese foi inicialmente baseada em estudos bioquímicos de diversidade genética (Second, 1982) e posteriormente suportada por análises moleculares (Kumagai *et al.*, 2010).

A predominância de autogamia no gênero *Oryza* determina que o fluxo gênico seja comumente restrito. Como resultado, é esperada grande diversidade genética entre populações geograficamente ou ecologicamente distantes. De fato, estudos têm revelado

alta diversidade genética entre populações de *Oryza* em diversas regiões onde o cultivo de arroz é importante. Um estudo realizado por Garris *et al.* (2005) indicou que a estrutura genética de 233 acessos de *Oryza sativa* oriundos dos cinco continentes é composta por cinco grandes grupos relacionados à subespécie ou ambiente que são indica, aus, aromatic, japonica tropical e japonica temperada. Entretanto, a composição genética dos acessos de arroz foi mostrada ser composta por misturas em diferentes graus destes grupos (Garris *et al.*, 2005).

No Brasil, estudos têm demonstrado alta variabilidade em cultivares tradicionais de arroz (Brondani *et al.*, 2006). Além disso, Borba *et al.* (2009a; 2009b) mostraram alta variabilidade tanto nas variedades tradicionais quanto nas variedades comerciais componentes do banco de germoplasma de arroz da Embrapa. Estes estudos indicaram haver notável estruturação genética das variedades baseadas tanto no sistema de cultivo em várzea ou em sequeiro, quanto na origem dos acessos (Borba *et al.*, 2009b).

A diversidade genética no gênero *Oryza* não se limita às variedades cultivadas. Também o arroz vermelho apresenta elevada variabilidade. Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que populações de arroz vermelho de certas regiões são compostas por misturas entre diversas espécies do gênero *Oryza* (Vaughan *et al.*, 2001; Reagon *et al.*, 2010). Estudos recentes mostraram que certas populações de arroz vermelho nos EUA estão estreitamente associadas a *O. sativa*, *O. nivara*, e *O. rufipogon* o que indica ocorrência de fluxo gênico entre estas espécies (Londo & Schaal, 2007; Gealy *et al.*, 2009). Ainda, Reagon *et al.* (2010) mostraram que acessos de arroz vermelho dos estados de Arkansas, Louisiana, Mississippi, Missouri e Texas, são compostas principalmente por *Oryza sativa spp indica* e *O. sativa spp indica vs aus*. Este fato é atribuído a diferentes eventos de introdução de espécies silvestres do gênero *Oryza* (Londo & Schaal, 2007) e também de variedades cultivadas que eventualmente

deixaram de ser exploradas comercialmente (Cao *et al.*, 2006). A possibilidade de hibridizações entre espécies possuindo o mesmo genoma, no caso AA, contribui para manutenção da variação genética do arroz vermelho e favorece sua persistência em praticamente todas as áreas de cultivo de arroz através de rápida adaptação a diferentes práticas agronômicas e climáticas (Reagon *et al.*, 2010).

Apesar do grande problema que o arroz vermelho representa para a cultura do arroz no Brasil, o conhecimento de sua diversidade genética no País ainda é limitado. Entretanto estão disponíveis ferramentas em biologia molecular capazes de caracterizar geneticamente populações de arroz vermelho. Os marcadores moleculares SSR, por exemplo, têm sido amplamente utilizados na caracterização genética de populações de diversas espécies incluindo o arroz (Duputie *et al.*, 2007; Uma *et al.*, 2009; Aper *et al.*, 2010; Shivrain *et al.*, 2010a).

2.6.1 Utilização de marcadores SSR na avaliação da diversidade genética

Os marcadores moleculares microssatélites, também conhecidos como SSR, são uma classe de repetições variáveis em tandem composta por uma pequena região de um a seis pares de nucleotídeos repetidos 100 vezes ou mais. Eles são encontrados no genoma nuclear de eucariotos e no genoma cloroplastidial de plantas (Ebert & Peakall, 2009; Jones *et al.*, 2009). Devido à sua alta taxa de mutações, estas regiões são de grande interesse na genética de populações (Udupa & Baum, 2001). As mutações resultam em marcadores altamente polimórficos, permitindo discriminação genética de indivíduos proximamente relacionados, mesmo utilizando um número relativamente baixo de marcadores. Ainda, mesmo nas espécies autógamas são encontradas variações alélicas nos *loci* microssatélites que permitem a distinção filogenética entre acessos. Um estudo realizado por Ren *et al.* (2003) comparou

marcadores SSR e *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) na caracterização de populações de arroz. Estes autores mostraram que os SSR foram mais eficazes em discriminar diminutas variações entre os acessos para um mesmo número de marcadores utilizados.

O caráter codominante dos marcadores SSR permite a distinção entre homozigotos e heterozigotos (Varshney *et al.*, 2005). Em organismos diploides, por exemplo, um marcador SSR indica um único alelo em um indivíduo homozigoto e dois alelos polimórficos em um indivíduo heterozigoto (Varshney *et al.*, 2005). O polimorfismo entre os alelos é devido ao número de vezes que o núcleo de bases se repete em cada alelo. Esta é uma grande vantagem destes marcadores, pois torna a análise de frequências alélicas e contagem dos genótipos extremamente simples (Jones *et al.*, 2009). Já a presença de múltiplos alelos por *locus* favorece a avaliação da diversidade genética de populações e subpopulações mesmo em espécies com alto grau de autogamia como o arroz (Zhang *et al.*, 2009).

Muitos estudos têm demonstrado a utilidade dos marcadores SSR na investigação e análise de diversidade genética e estrutura de populações em várias espécies de plantas (Menezes *et al.*, 2010; Narzary *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Uysal *et al.*, 2010). Em relação ao arroz, os marcadores SSR têm sido utilizados na investigação da diversidade das variedades cultivadas (Borba *et al.*, 2009a), tradicionais (Vaz *et al.*, 2009), na determinação de hibridizações entre espécies silvestres do gênero *Oryza* (Dong *et al.*, 2010), e ainda em estudos de evolução das espécies desse gênero (Zhang *et al.*, 2009). A diversidade genética de populações de arroz vermelho também tem sido estudada tendo marcadores SSR como ferramentas principais. Esta é uma diferença importante em relação a estudos genéticos de outras plantas daninhas, que geralmente têm aplicação restrita devido à limitada disponibilidade de marcadores

moleculares eficazes. Marcadores moleculares desenvolvidos para o arroz cultivado podem ser utilizados em arroz vermelho, resultando em elevada capacidade de análises genéticas desta planta daninha.

2.6.2 Análises de variabilidade e estrutura genética

A diversidade genética pode ser analisada a partir de um *locus* gênico em três níveis (Wright, 1943). Em indivíduos, a diversidade genética pode ser observada quando se encontram indivíduos homozigotos e heterozigotos. Já em populações, a diversidade está presente quando indivíduos diferentes apresentam alelos diferentes. Em uma espécie, a diversidade pode estar presente entre populações, no caso de algumas destas populações possuírem alelos que outras não possuem (Wright, 1943). Neste caso, é dito que a diversidade está dividida entre populações de uma espécie (Lowe *et al.*, 2004).

A avaliação da diversidade genética pode ser realizada baseando-se nas frequências alélicas obtidas através de marcadores moleculares codominantes como os SSR (Laurentin, 2009). Estes permitem a detecção de alelos individuais em cada *locus*, tanto heterozigoto como homozigoto. A partir disso, o número de alelos por *locus* e o número de *loci* polimórficos podem ser calculados. Os valores observados são indicadores de diversidade genética (Hartl & Clark, 2007).

O número de alelos por *locus* (A), conhecido também como riqueza alélica, é obtido pela relação entre o número de alelos encontrados em uma população e o número total de *loci* estudados. Já o número de *loci* polimórficos (P) é a relação entre o número de *locus* polimórficos e o número total de *loci* estudados em uma população (Lange, 2003). Este valor indica a quantidade de polimorfismo existente em uma população e permite a comparação entre populações. Ainda, é possível calcular o número de alelos por *locus* polimórfico (AP) que é a relação entre o número de alelos

observados em *loci* polimórficos pelo número de *loci* polimórficos estudados (Lowe *et al.*, 2004). Medidas mais informativas podem ser obtidas das frequências alélicas observadas, que permitem comparações entre a heterozigosidade esperada e observada. A heterozigosidade observada (H_o) é a proporção de indivíduos heterozigotos nas amostras da população. A heterozigosidade esperada (H_e), também referida como diversidade total de Nei (1973, 1978), é definida como a quantidade de heterozigosidade que estaria presente em uma população, dada uma frequência alélica observada em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A diversidade total (H_T), existente em uma população é resultante de duas proporções distintas. A proporção de diversidade que é devida à variação dentro das populações é conhecida como H_S . Este valor representa a heterozigosidade média dentro das populações. Já a proporção referente à variação entre populações é conhecida como D_{ST} (Nei, 1973, 1978). A razão entre estas duas proporções, D_{ST} e H_S , resulta na proporção da diversidade genética devida à diferença entre subpopulações em relação à diversidade genética na população. Esta razão é chamada de coeficiente de diferenciação genética de Nei ou G_{ST} (Nei, 1973, 1978).

O índice G_{ST} de Nei (1973, 1978) é equivalente ao índice F_{ST} de Wright (1951), contudo existem diferenças entre eles. O índice F_{ST} foi desenvolvido para subpopulações infinitas e dialélicas, baseado nas probabilidades de homozigose por descendência (Neigel, 2002). Por outro lado, o G_{ST} , baseado em heterozigosidades esperadas e observadas, foi desenvolvido para amostras de populações contendo poucas subpopulações e multialélicas (Nei, 1973).

Além das análises de diversidade dentro e entre populações baseadas em frequências alélicas, outra metodologia comumente utilizada é a análise de variância molecular (Analysis of Molecular Variance - AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992). Nesta

metodologia, a matriz de distância entre os pares de genótipos é utilizada em um esquema de análise de variância produzindo estimativas de componentes de variância equivalentes às estatísticas F de Wright (Laurentin, 2009). A principal diferença desta para a análise de variância convencional é como a significância dos componentes é testada (Laurentin, 2009). Em análise de variância convencional a distribuição normal é assumida, entretanto, em dados moleculares isso não ocorre, por isso são usadas permutações (Excoffier *et al.*, 1992). O modelo mais simples de AMOVA é representado por variação entre grupos, variação dentro dos grupos e erro como fontes de variação (Laurentin, 2009).

A determinação de populações é fundamental em estudos de genética de populações. Normalmente isto é realizado a partir da origem geográfica das amostras ou fenótipos. Entretanto, a estrutura genética de populações nem sempre está relacionada com a distância geográfica dos indivíduos (Evanno *et al.*, 2005). Por isso, nos últimos anos métodos de *assignment* têm sido amplamente utilizados em estudos de genética de populações (Londo & Schaal, 2007; Aper *et al.*, 2010; Hufford *et al.*, 2011). Um dos modelos de *assignment* mais utilizados é o proposto por Pritchard *et al.* (2000). Neste modelo, os acessos são agrupados probabilisticamente por meio de inferência bayesiana a um número K de populações, sendo o valor de K desconhecido. O método busca determinar a população à qual pertence cada indivíduo a partir de matrizes de F_{ST} , sem considerar informações de coleta destes indivíduos (Pritchard *et al.*, 2000). Este método vem sendo continuamente aperfeiçoado com o intuito de conferir maior robustez aos resultados obtidos com os mais variados conjuntos de dados (Falush *et al.*, 2003; Evanno *et al.*, 2005; Hubisz *et al.*, 2009). Assim, vários estudos sobre estrutura populacional de arroz e arroz vermelho têm sido realizados com base neste método (Garris *et al.*, 2005; Londo & Schaal, 2007; Gealy *et al.*, 2009; Shivrain *et al.*, 2010c).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A evolução de populações de arroz vermelho resistente a herbicidas requer medidas de controle específicas, que visem impedir o surgimento de novos casos e a disseminação de indivíduos resistentes. Dessa forma, são necessários conhecimentos que permitam a determinação da origem da resistência, da disseminação da resistência entre populações e da adaptação diferencial de arroz resistente aos herbicidas. Com o objetivo de alcançar estes conhecimentos foram realizados os seguintes experimentos 3.1) determinação da origem da resistência de arroz vermelho às imidazolinonas; 3.2) quantificação do fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente, 3.2.2) análise da estrutura populacional e avaliação do fluxo gênico entre populações de arroz vermelho do RS e; 3.3) avaliação da adaptação de cultivares de arroz resistentes à herbicidas inibidores da ALS.

Os experimentos para determinação da origem da resistência em populações de arroz vermelho e de avaliação da adaptação em cultivares resistentes foram realizados no Laboratório da Flora Ruderal (LAFLOR) e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre/RS. O experimento de determinação do fluxo gênico a partir de plantas de arroz vermelho resistente foi realizado na Estação Experimental do Arroz (EEA) do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) em Cachoeirinha/RS e as avaliações de fluxo gênico foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do

Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS. O experimento de estrutura genética e fluxo gênico entre populações de arroz vermelho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Santo Antônio de Goiás/GO. Todos os experimentos foram realizados nos anos de 2009 e 2010.

3.1 Determinação da origem da resistência de arroz vermelho

3.1.1 Material Vegetal

O estudo foi realizado em casa-de-vegetação do LAFLOR e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS. O material vegetal utilizado foi cedido pelo IRGA, e corresponde a 176 indivíduos oriundos de 15 populações de arroz vermelho resistentes a herbicidas imidazolinonas coletados na safra 2007/08 (Tabela 1). Adicionalmente, foram utilizadas como controle, as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL, e híbridos obtidos por cruzamentos artificiais entre estas cultivares e quatro biótipos de arroz vermelho.

TABELA 1. Populações de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic coletados em diferentes locais do estado de RS na safra 2007/08.

População	Município de Origem	Mutação ¹
32	Restinga Seca	Ser ₆₅₃ Asn
47	Caçapava do Sul	Gly ₆₅₄ Glu
48	São Martinho da Serra 1	Gly ₆₅₄ Glu
49	São Martinho da Serra 2	Gly ₆₅₄ Glu
50	Santa Maria 1	Gly ₆₅₄ Glu
51	Santa Maria 2	Gly ₆₅₄ Glu
66	Alegrete	Gly ₆₅₄ Glu /Ser ₆₅₃ Asn
124	Novos Cabrais	Gly ₆₅₄ Glu
135	Dona Francisca	Gly ₆₅₄ Glu/Ala ₁₂₂ Thr/ Ser ₆₅₃ Asn
136	Agudo	Gly ₆₅₄ Glu
201	Camaquã	Gly ₆₅₄ Glu
235	São Gabriel	Ser ₆₅₃ Asn
265	Rosário do Sul 1	Gly ₆₅₄ Glu
267	Rosário do Sul 2	Gly ₆₅₄ Glu
274	Uruguaiana	Gly ₆₅₄ Glu

¹Descritas por Roso *et al.*, (2010).

A fenotipagem da resistência aos herbicidas imazethapyr + imazapic destas populações foi realizada por Menezes *et al.* (2009). Além disso, Roso *et al.* (2010a) caracterizou o mecanismo de resistência como local de ação alterado nestes indivíduos. As mutações encontradas no gene da ALS destes biótipos foram Gly₆₅₄Glu, Ala₁₂₂Thr, e Ser₆₅₃Asn (Tabela 1). Estas mutações estão presentes nas cultivares resistentes IRGA 422 CL (Gly₆₅₄Glu), PUITÁ INTA CL (Ala₁₂₂Thr) e Sator CL (Ser₆₅₃Asn).

3.1.2 Extração de DNA e análise molecular por marcadores SSR

As amostras de DNA genômico utilizadas neste estudo foram obtidas de aproximadamente 150mg de tecido foliar de plantas das populações de arroz vermelho, das cultivares de arroz e dos híbridos. A extração de DNA genômico foi realizada conforme metodologia descrita no Apêndice 1. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (Genesys 2™, Thermo Spectronic) e em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e padrão Lambda de 100 e 1000 pb (Invitrogen). Posteriormente, o DNA foi diluído em TE 1x e armazenado a -5°C com a concentração de 25ng/μL.

Inicialmente, foram selecionados oito *loci* SSR para testes de polimorfismo entre arroz cultivado e arroz vermelho (Tabela 2). Estes marcadores foram utilizados anteriormente em trabalhos similares, realizados para identificação de híbridos descendentes do cruzamento de arroz cultivado e arroz vermelho no Brasil (Brunes *et al.*, 2007), nos EUA (Rajguru *et al.*, 2005; Shivrain *et al.*, 2007) e Índia (Sundaram *et al.*, 2008), e na avaliação da diversidade genética de populações de arroz vermelho nos EUA (Gealy *et al.*, 2009). A avaliação do polimorfismo dos marcadores SSR foi realizada com base na comparação visual dos alelos encontrados em cada *locus* para as cultivares de arroz IRGA 422 CL, IRGA 417, PUITÁ INTA CL e Sator CL, acessos de arroz vermelho e os híbridos entre estes materiais. Foram considerados

polimórficos os marcadores que apresentaram alelos distintos entre as cultivares e o arroz vermelho em homozigose e os dois alelos nos indivíduos híbridos.

A PCR foi realizada com base no seguinte protocolo: 25 ng de DNA; 0,3 µL de cada iniciador (*forward* e *reverse*); 150µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 0,5 U de Taq DNA polimerase; 1x buffer e; 0,6 mM de MgCl₂, em um volume total de 12 µL por reação. As reações foram sujeitas a 5 min de desnaturação a 94°C, 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 56, 57 ou 60°C, dependendo do marcador, 1min a 72°C e 10min a 72°C. Os termocicladores utilizados foram do modelo PTC-100™ (MJ Research). Os tamanhos dos fragmentos foram determinados pela comparação visual com marcador de 100pb (Invitrogen) em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio. Posteriormente, os géis foram fotografados com o programa KODAK Digital Science 1D. Após experimentos de otimização das reações, os marcadores não polimórficos foram descartados do ensaio. Os marcadores polimórficos foram utilizados nas etapas seguintes do presente estudo. Com o objetivo de aumentar a precisão da análise genotípica dos acessos de arroz vermelho resistentes foi utilizada a técnica de marcação dos fragmentos com fluoróforo através do oligonucleotídeo iniciador universal M13 conhecida como *M13 Tail* PCR, conforme descrito por Schuelke (2000). Nesta técnica, os iniciadores *forward* de cada marcador molecular devem ter uma sequência universal de 18pb adicionada na extremidade 5' (Figura 1). Esta sequência é chamada de cauda M13. Os iniciadores *reverse* não são alterados em relação à sua utilização regular (Figura 1).

TABELA 2. Marcadores SSR utilizados na determinação da origem da resistência em acessos de arroz vermelho resistentes à imidazolinonas.

Locus SSR	C	Sequências nucleotídicas (5' - 3')		Sequência repetida	TA (°C)	Referência de polimorfismo
		Forward	Reverse			
4797	4	GGAGAAGGCAATGCAACACG	GCCATTGCCGCCAAGTACTA	AGC	60	Brunes <i>et al.</i> , 2007
RM106	2	GCCCCGCTGCTACTACTTCTGC	CTCTAGGTGCTGCCCTACCCGG	GAA	56	Gealy <i>et al.</i> , 2009
RM180	7	CTACATCGGCTTAGGTGTAGCAACACG	ACTTGCTCTACTTGTGGTGAGGGACTG	ATT	57	Rajguru <i>et al.</i> , 2005
RM234	7	GGTCCCGAACCTATGACA	GAGGCAGAAACAGAGTGAC	CT	56	Shivrain <i>et al.</i> , 2008
RM251	3	GAATGGCAATGGCGCTAG	ATGCGGTTCAAGATTCGATC	CT	57	Rajguru <i>et al.</i> , 2005
RM253	6	TCCTTCAAGAGTGCAAAACC	GCATTGTCATGTGCAAGCC	GA	56	Shivrain <i>et al.</i> , 2008
RM341	2	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC	CTT	56	Sundaram <i>et al.</i> , 2008
RM475	2	CCTCACGATTTTCCTCCAAC	ACGGTGGGATTAGACTGTGC	TATC	57	Sundaram <i>et al.</i> , 2008

¹C, cromossomo de localização. ²TA, temperatura de anelamento.

TABELA 3. Marcador universal M13 e marcadores *Single Sequence Repeats* com respectivos iniciadores *forward* acrescidos com cauda M13 (sublinhada).

Locus SSR	Sequências nucleotídicas (5' - 3')		TA (°C) ¹
	Forward	Reverse	
M13	6-FAM-TGTAAAACGACGGCCAGT	-	53
4797	<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> GGAGAAGGCAATGCAACACG	GCCATTGCCGCCAAGTACTA	60
RM251	<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> GAATGGCAATGGCGCTAG	ATGCGGTTCAAGATTCGATC	57
RM253	<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCAAAACGTGAGAACTTCCT	CCGAAGCTGTACTGTTACG	56
RM341	<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC	56
RM475	<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> CCTCACGATTTTCCTCCAAC	ACGGTGGGATTAGACTGTGC	57

¹TA, temperatura de anelamento.

Com o objetivo de automatizar a detecção dos alelos em sequenciadores automáticos, utilizou-se o iniciador M13 marcado com fluoróforo. Neste ensaio foi utilizado o 6-FAM (6-carboxi-fluorescina). A PCR é realizada com três oligonucleotídeos iniciadores, *forward* com cauda M13, *reverse* e o M13 marcado com 6-FAM (Figura 1). A PCR então ocorre em duas etapas. Na primeira etapa ocorre a amplificação dos fragmentos de forma usual a partir dos iniciadores *forward* e *reverse* em aproximadamente 30 ciclos (Schuelke, 2000). Estes fragmentos contêm a cauda M13 na extremidade *forward* (Figura 1). Na sequência, são incluídos mais oito ciclos com o objetivo de inserir o iniciador M13 marcado com 6-FAM nos fragmentos amplificados pelos ciclos anteriores (Schuelke, 2000). Dessa forma, os fragmentos podem ser visualizados tanto em gel de agarose quanto em sequenciador automático. A vantagem desta técnica está na marcação dos fragmentos durante a reação de PCR, o que evita gastos com síntese de cada marcador contendo fluoróforos, uma vez que apenas o M13 requer marcação e pode ser utilizado com vários iniciadores distintos.

Cada um dos marcadores moleculares polimórficos deste ensaio foi sintetizado com a cauda M13 na extremidade 5' do iniciador *forward* (Tabela 3). Novos testes foram realizados nas cultivares, no arroz vermelho e nos híbridos para confirmar o polimorfismo dos marcadores após a resíntese na qual os iniciadores *forward* continham a cauda M13. Os marcadores que não apresentaram polimorfismos ou não foram consistentes nas amplificações foram descartados do estudo.

As reações PCR, nesta etapa, seguiram o seguinte protocolo: 25 ng de DNA; 0,2 µM de cada iniciador *forward* com cauda M13; 0,8 µM de cada iniciador *reverse*; 0,8 µM de M13 marcado com 6-FAM; 0,150µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 0,5 U de Taq DNA polimerase; 1x buffer e; 0,6 mM de MgCl₂, em um volume total de 12 µL por reação. As reações foram sujeitas a 5 min de desnaturação a 94°C, 30

ciclos de 45s a 94°C, 45s a 56, 57 ou 60°C, dependendo do marcador, 1min a 72°C; 8 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 53°C, dependendo do marcador, 1min a 72°C e 10min a 72°C. A genotipagem dos acessos foi realizada pelo laboratório Macrogen (Seul, Coreia do Sul) através de sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems). A detecção de alelos típicos das cultivares de arroz e dos acessos de arroz vermelha foi realizada com base nas frequências alélicas. Estas foram calculadas pelo *software* PowerMaker (Liu & Muse, 2005).

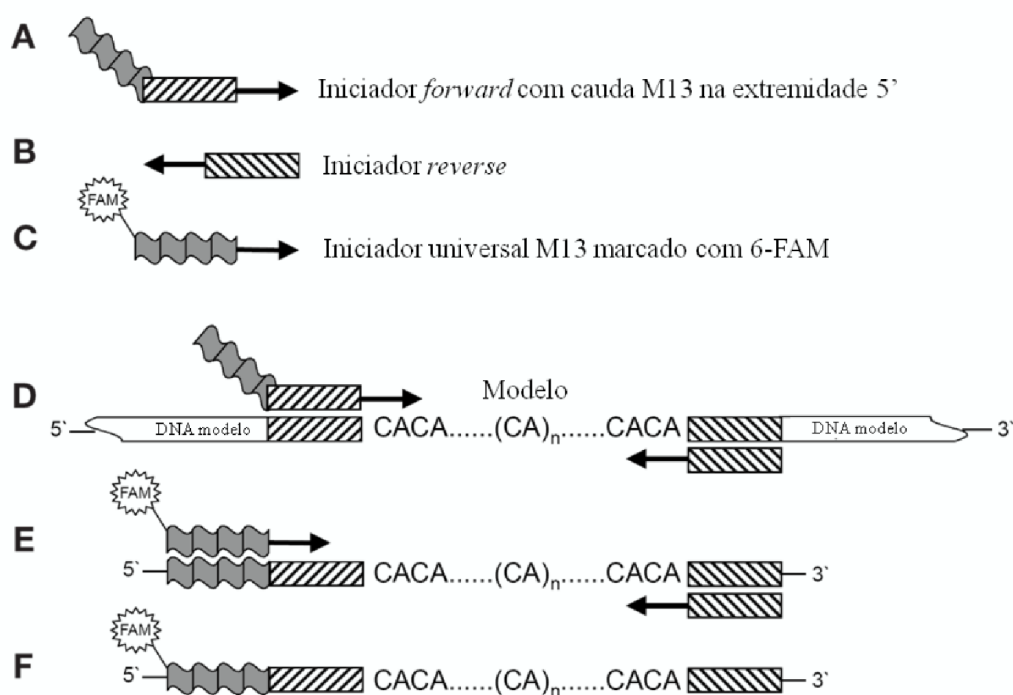


FIGURA 1. Esquema hipotético dos oligonucleotídeos iniciadores e da amplificação de um fragmento SSR pelo método M13 *tail* PCR. A) oligonucleotídeo iniciador *forward* contendo a cauda M13 na extremidade 5'. B) oligonucleotídeo iniciador *reverse* não alterado. C) oligonucleotídeo iniciador universal M13 marcado com o fluoróforo 6-FAM. D) Primeira etapa da PCR. O iniciador *forward* com a cauda M13 é incorporado aos fragmentos de DNA. E) Segunda etapa da PCR. O iniciador M13 marcado com 6-FAM anela-se à cauda M13 dos fragmentos. F) os fragmentos finais contêm o fluoróforo 6-FAM e podem ser analisados em sequenciador automático. Adaptado de Schuelke, 2000.

A análise genotípica para determinação da origem da resistência dos acessos de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas foi realizada com marcadores

moleculares SSR através de análise de paternidade por exclusão (Slavov *et al.*, 2005). Neste método os genótipos dos acessos avaliados são comparados com os genótipos dos potenciais genitores masculinos, ou doadores de pólen, que no presente estudo serão as cultivares de arroz indicadas anteriormente. Devido ao fato de os marcadores SSR serem codominantes, os indivíduos híbridos entre cultivares de arroz e arroz vermelho podem ser detectados pela presença de ambos os alelos parentais. Estes indivíduos apresentam um alelo oriundo da cultivar de arroz e outro do arroz vermelho, caracterizando o polimorfismo do marcador (Gealy *et al.*, 2002). Assim, a origem da resistência dos acessos de arroz vermelho quanto à seleção independente foi determinado pela ausência de alelos semelhantes aos das cultivares resistentes às imidazolinonas IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL.

O método descrito acima é uma adaptação do método de paternidade por exclusão, no qual os indivíduos testados são avaliados quanto à existência ou não de alelos de possíveis genitores (Slavov *et al.*, 2005). Os alelos observados nos indivíduos de arroz vermelho foram comparados com aqueles observados nas cultivares de arroz e plantas de arroz vermelho suscetíveis às imidazolinonas. A origem da resistência foi considerada seleção independente quando um indivíduo possuiu somente alelos típicos de arroz vermelho e ou da cultivar IRGA 417. A presença de mutações em indivíduos com estas características indica seleção da mutação pelo uso contínuo dos herbicidas imidazolinonas. Por outro lado, a origem da resistência por fluxo gênico foi considerada quando um indivíduo apresentou ao menos um alelo típico de quaisquer cultivares resistentes às imidazolinonas. Isso porque após um evento de fluxo gênico o indivíduo gerado apresenta a maioria dos alelos em heterozigose. Entretanto, nas gerações seguintes de autofecundação a homozigose aumenta e alguns alelos são perdidos. As mutações no gene da ALS foram utilizadas como auxiliares no diagnóstico.

3.2 Quantificação do fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente e entre populações de arroz vermelho do RS

Foram conduzidos dois experimentos para a quantificação do fluxo gênico entre populações de arroz vermelho. O primeiro experimento foi realizado na EEA-IRGA na safra 2009/2010. O solo predominante na EEA é classificado como Gleissolo Háptico Ta distrófico típico, com cerca de 140g de argila/kg de solo e pH em água de 4,7 (EMBRAPA, 1999). Estes solos caracterizam-se pela pouca profundidade, por serem mal drenados e por possuírem coloração escura devido à redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} . O segundo experimento foi baseado em populações de arroz vermelho coletadas a campo, e cuja análise fenotípica e molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS e no Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA Arroz e Feijão.

3.2.1 Fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente às imidazolinonas

3.2.1.1 Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi realizado a campo com delineamento blocos casualizados 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 IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL, Sator CL e ao biótipo de arroz vermelho resistente à imidazolinonas, denominado AVR, que contém a mutação Gly₆₅₄Glu no gene da ALS.

O experimento foi realizado com 4 repetições, totalizando 32 parcelas em uma área de 1568m². A medida de cada parcela foi de 7x7m, com área de 49m².

3.2.1.2 Instalação e condução do experimento

Com o objetivo de sincronizar a época de florescimento, estágio R4-R5 da escala Counce (Counce *et al.*, 2000), entre as plantas doadoras e receptoras, sementes das plantas doadoras foram semeadas em vasos em casa-de-vegetação, durante períodos anteriores e posteriores à semeadura das receptoras. A semeadura consistiu de cinco épocas com intervalos de 10 dias (Figura 2). As plantas foram transplantadas para a área de cultivo do experimento quando alcançaram o estágio V3. O esquema de semeadura, ilustrado na, garantiu o fornecimento de pólen das plantas doadoras no momento em que as plantas receptoras floresceram. As plantas receptoras foram semeadas no dia 19 de dezembro de 2009 em uma densidade de semeadura de 85 kg/ha e espaçamento entrelinhas de 0,17m. O sistema de cultivo foi o convencional com uma aração e uma gradagem leve. A dessecação foi realizada dez dias antes da semeadura com o herbicida glyphosate em dose de 720 g e.a. A adubação de base foi de 350 kg adubo NPK na formulação 5-20-30. O controle das plantas daninhas foi executado com os herbicidas penoxulan e cyalofop-butyl nas doses de 60 e 315g/ha respectivamente. Plantas de arroz vermelho ou arroz cultivado voluntárias foram eliminadas manualmente da área experimental durante todo o experimento. A adubação de cobertura foi realizada com 80 kg/ha de N. O controle de insetos foi realizado com o inseticida tiametoxam na dose de 35g/ha. O manejo das doenças foi realizado com os fungicidas kresoxim methyl e epoxiconazole na dose de 94g/ha cada.

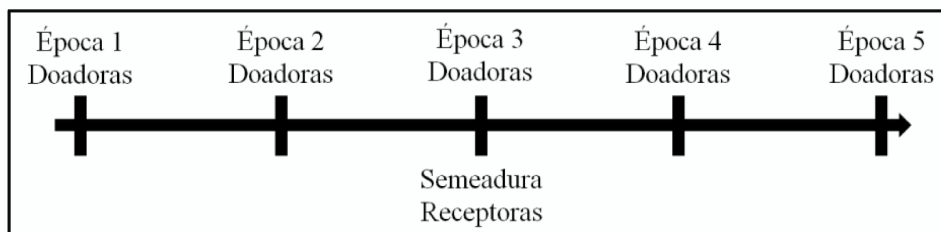


FIGURA 2. Esquema das épocas de semeadura das plantas doadoras - IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL, Sator CL e arroz vermelho resistente; e plantas receptoras - IRGA 417 e arroz vermelho suscetível. Cada época de semeadura foi realizada com intervalo de 10 dias.

Quando as plantas receptoras estavam em estágio R3, período em que se inicia a exsereção das panículas, uma planta doadora em estágio R4 (antese) foi transplantada para o centro da respectiva parcela conforme aleatorização do delineamento experimental. As plantas de AVS iniciaram o estágio R4 no dia 19 de fevereiro enquanto as plantas da cultivar IRGA 417 atingiram este estágio no dia 2 de março de 2010. Ao final do estágio R4 das plantas doadoras, estas foram trocadas e repostas por outras em R4 em cada parcela, a fim de garantir o fornecimento de pólen às receptoras até que estas chegassem ao final do estágio R4. Imediatamente após a finalização 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.

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 parcela, a partir da distância de 0,5; 1,5; 2,5 e 3,5m, em quatro direções totalizando 16 amostras por parcela (Figura 3). As panículas colhidas foram trilhadas e posteriormente as sementes foram limpas em sopradores verticais para retirada de partículas de solo e grãos chochos.

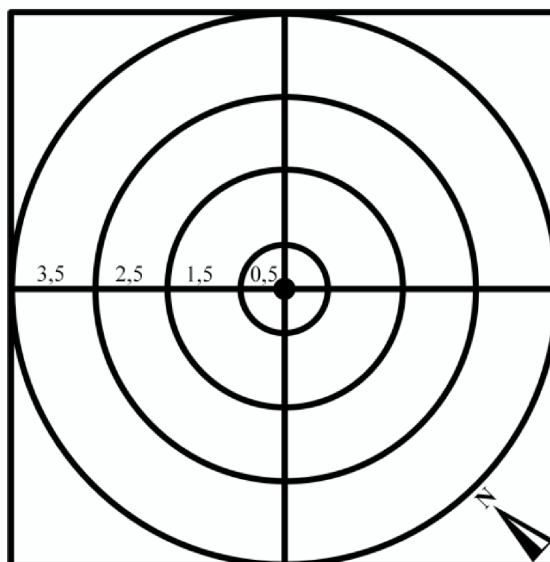


FIGURA 3. Esquema de uma parcela do experimento de quantificação do fluxo gênico em condições de campo. O círculo preto ao centro representa a planta doadora de pólen. Os valores indicam o raio do semicírculo. Cachoeirinha, RS. 2010.

3.2.1.3 Determinação do tamanho da amostra

Um dos fatores importantes em estudos de fluxo gênico em arroz é a determinação do tamanho da amostra (n) a ser avaliado para obtenção de resultados consistentes. No caso do arroz em que a frequência de alogamia na espécie é de aproximadamente 0,01 (Shivrain *et al.*, 2009a) esta determinação é fundamental para obtenção de precisão experimental satisfatória. Se o “ n ” é demasiado pequeno a precisão do experimento é prejudicada devido à representação inadequada da população em análise. Por outro lado, se o “ n ” é muito grande, o tempo e outros recursos são desperdiçados com ganho insignificante. Assim, um cálculo baseado no poder do teste ($1-\beta$) e no nível de confiança (α) deve ser usado para estimar o “ n ” adequado para detectar as sementes híbridas (Jhala *et al.*, 2010). As Equações 1, 2 e 3 abaixo foram utilizadas para determinar o “ n ” na detecção de híbridos em ensaio de fluxo gênico conforme proposto por Mcpherson *et al.* (2009) e Jhala *et al.* (2010).

EQUAÇÃO 1.

$$\beta = P \left(Z < \frac{p_0 - p}{\sqrt{\frac{pq}{n}}} - Z_\alpha \sqrt{\frac{p_0 q_0}{pq}} \right)$$

EQUAÇÃO 2.
$$n = \frac{pq \left(\phi^{-1}(\beta) + Z_{\alpha} \sqrt{\frac{p_0 q_0}{pq}} \right)^2}{(p_0 - p)^2}$$

EQUAÇÃO 3.
$$n = \frac{(p_0 - \Delta)(1 - p_0 + \Delta) \left[\phi^{-1}(\beta) + Z_{\alpha} \sqrt{\frac{p_0(1 - p_0)}{(p_0 - \Delta)(1 - p_0 + \Delta)}} \right]^2}{\Delta^2}$$

Onde, “n”, tamanho da amostra requerida em número de sementes; β , poder do teste; Z, variável randômica seguindo N(0,1); q, 1-p; q_0 , 1- p_0 ; p_0 , parâmetro hipotetizado na hipótese nula (frequência de fluxo gênico); p, frequência teórica de fluxo gênico; Δ , efeito do tamanho ($p_0 - p$); Z_{α} , valor crítico para nível de significância α ; ϕ^{-1} , antifução da curva normal. Os valores de “n” calculados são mostrados na Tabela 4.

TABELA 4. Tamanho da amostra, em número de sementes, em função de três níveis de confiança (α) e três níveis de poder do teste.¹

Frequência de fluxo gênico	Confiança (α)								
	$\alpha=5\%$ $\alpha=2,5\%$ $\alpha=1\%$			$\alpha=5\%$ $\alpha=2,5\%$ $\alpha=1\%$			$\alpha=5\%$ $\alpha=2,5\%$ $\alpha=1\%$		
	Poder=0,80			Poder=0,85			Poder=0,95		
0,01	1989	2588	3383	2242	2875	3710	3128	3869	4829
0,005	3996	5199	6767	4503	5776	7454	6282	7771	9700
0,0025	8010	10422	13625	9026	11577	14941	12590	15573	19441
0,001	20052	26090	34109	22595	28980	37402	31513	38982	48664
0,0005	40122	52204	68248	45209	57985	74837	63051	77995	97368

¹ Adaptado de Jhala *et al.* 2010.

O “n” aumenta com a diminuição da frequência de fluxo gênico (Tabela 4). A frequência de fluxo gênico, por sua vez, diminui com o aumento da distância entre a planta doadora de pólen e a receptora. Entretanto, diversos trabalhos têm mostrado que distâncias de 0,3 a 3,5m apresentam uma frequência de fluxo gênico de 0,01 em plantas de arroz (Messeguer *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Messeguer *et al.*, 2004; Shivrain *et al.*, 2007; Shivrain *et al.*, 2009a). Dessa forma, para

detectar o fluxo gênico entre plantas de arroz com um nível de confiança de 95% e um poder de 0,8 o “n” necessário estimado foi de 1989 sementes por avaliação (Tabela 5).

Assim, considerando que em cada uma das 32 parcelas foram coletadas 16 amostras de 1989 sementes, o total de sementes avaliadas neste experimento foi de aproximadamente 1 024 000. Metade deste valor foi referente às sementes de arroz vermelho e a outra metade referente à cultivar IRGA 417 ambas receptoras de pólen.

3.2.1.4 Identificação dos indivíduos híbridos

A detecção de indivíduos resistentes via fluxo gênico foi realizada através de bioensaio de embebição de sementes conforme metodologia proposta por Roso *et al.* (2010b). Este método consiste da embebição das sementes em solução herbicida por 24h e posterior exposição à germinação em câmara de germinação. Nesta etapa do ensaio foi utilizado o herbicida inibidor de ALS imazethapyr, na concentração de 0,2 mM. Esta concentração foi obtida em experimento-piloto de dose resposta no qual se avaliou o comprimento de raízes de sementes de arroz vermelho e cultivares conhecidamente resistentes ou suscetíveis a este herbicida em 4 concentrações crescentes de imazethapyr com quatro repetições. A escolha da concentração ótima foi realizada com base na curva de dose e resposta em que a diferença entre os comprimentos radiculares das plântulas resistentes e suscetíveis foram maiores (FIGURA 4).

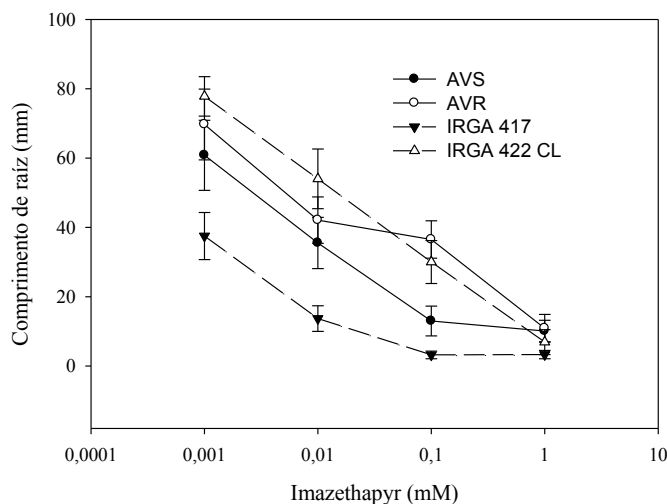


FIGURA 4. Comprimento de raízes de cultivares de arroz e biótipos de arroz vermelho resistentes e suscetíveis à imazethapyr em função de concentrações crescentes do herbicida. Porto Alegre, RS. 2010.

Foi realizada quebra de dormência nas sementes de arroz vermelho através da exposição à temperatura de 55°C em estufa por seis dias. Posteriormente, as sementes foram embebidas em solução de imazethapyr 0,2 mM por 24h. Em seguida estas foram acondicionadas em folhas de papel germinador sob a forma de rolo. Os rolos contendo as sementes foram posicionados verticalmente no interior de copos tipo Becker com capacidade para 2000 mL. A germinação ocorreu em câmara de germinação sob a temperatura de 25°C por cinco dias. A umidade dos rolos foi mantida por subirrigação, conservando uma lâmina de água destilada com aproximadamente 20 mm no interior dos recipientes. As avaliações ocorreram seis dias após a embebição das sementes. As sementes resistentes e suscetíveis foram discriminadas pelo comprimento radicular após cinco dias na câmara de germinação. Para tanto, as raízes das sementes foram comparadas aos padrões resistentes e suscetíveis a imidazolinonas. Os padrões suscetíveis foram a cultivar IRGA 417 e o arroz vermelho suscetível, enquanto que os

padrões resistentes foram a cultivar IRGA 422 CL e o arroz vermelho resistente (Figura 5).



FIGURA 5. 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 0,2 mM e posterior germinação em câmara de germinação a 25°C. Porto Alegre, RS. 2010.

As plântulas selecionadas como resistentes no bioensaio de germinação foram plantadas em vasos de 300 ml e quando atingiram estágio V4 foram aspergidas com imazethapyr na dose de 100g/ha. A aplicação do herbicida foi realizada com pulverizador costal manual pressurizado com CO₂, com pressão de 35 lb pol⁻², bicos 110.02 AD, resultando em uma vazão de 200 l.ha⁻¹. Este procedimento foi realizado a fim de eliminar falsos positivos, uma vez que a seleção das plantas receptoras resistentes nos bioensaios foi realizada visualmente. Posteriormente, foi extraído DNA genômico de 32 plantas selecionadas aleatoriamente identificadas como híbridos conforme metodologia descrita no item 3.1. Foram utilizados marcadores moleculares SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) desenvolvidos por Roso *et al.* (2010a) (Tabela 5) a fim de identificar quais mutações estavam presentes em cada planta receptora e observar se estas corresponderam às mutações das respectivas plantas doadoras.

TABELA 5. Plantas doadoras de pólen utilizadas no ensaio de fluxo gênico, respectivas mutações na enzima Acetolactato sintase (ALS) e marcadores SNP utilizados para identificação das mutações nos indivíduos híbridos.

Plantas doadoras	Mutação presente na ALS	Marcador SNP	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Fragmento esperado (pb)
IRGA 422 CL e AVR ¹	Gly ₆₅₄ Glu	SNP422Fw1	GCTGCCTATGATCCCAAGTCA	133
		SNP422Fw2	GCTGCCTATGATCCCAAGGGA	
Sator CL	Ser ₆₅₃ Asn	SNPSatFw1	ATGTGCTGCCTATGATCCCATA	137
		SNPSatFw2	GTGCTGCCTATGATCCCGAA	
PUITÁ INTA CL	Ala ₁₂₂ Thr	SNPPtaRev1	CCTGGTGGATCTCCATGGACTT	253
		SNPPtaRev2	CTGGTGGATCTCCATGGAGGT	

¹arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas.

As reações PCR, nesta etapa, seguiram o seguinte protocolo: 50 ng de DNA; 0,166 µM de cada sequência nucleotídica iniciadora (*forward* e *reverse*); 0,166 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 0,2 U de Taq DNA polimerase; 1x buffer e; 1,5 mM de MgCl₂; 1,3 µL de DMSO 100%, em um volume total de 15 µL por reação. As reações foram sujeitas a 5 min de desnaturação a 94°C, 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 55, 1min a 72°C e 10min a 72°C. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose (3%) corado com brometo de etídeo na proporção de 0,02 µL ml⁻¹, por 120 minutos a 110 V em tampão TBE 0,5X (40 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8,0). Após, cada gel foi fotografado com auxílio do programa KODAK DIGITAL SCIENCE 1D.

As sementes identificadas como resistentes pelo bioensaio, pela aplicação do herbicida imazethapyr e pelos marcadores moleculares SNP caracterizam-se como híbridos oriundos do fluxo gênico entre as plantas doadoras e receptoras de pólen de cada tratamento. Isso porque a proporção esperada na geração F1 de alogamia é de 100% heterozigotos, que neste caso seriam resistentes ao herbicida imazethapyr, pois esta característica é regida por dois alelos em relação de dominância (Shivrain *et al.*, 2006)

3.2.1.5 Análises estatísticas

A determinação 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 (ANOVA) e, havendo significância no teste F, foram submetidos ao teste de comparações de média de Tukey ao nível de 5%. Foi realizada análise de regressão linear do fluxo gênico em função da distância da fonte doadora de pólen.

Estas análises permitiram a quantificação do fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente para arroz vermelho suscetível. Assim, foi quantificada a introgressão do alelo mutante em população suscetível ao herbicida imazethapyr. Além disso, foi quantificada o fluxo gênico de cultivares resistentes para a cultivar suscetível IRGA 417 em condições de campo.

3.2.2 Análise da estrutura populacional e determinação do fluxo gênico entre populações de arroz vermelho

3.2.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas 27 populações de arroz vermelho oriundas de lavouras comerciais de arroz irrigado do RS coletadas na safra 2009/2010. 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 foram identificadas com base na região e município de coleta (Tabela 6). As panículas coletadas foram armazenadas separadamente em saco de papel em temperatura ambiente. O método de amostragem foi o aleatório simples, através de caminhamento em 'W' nas áreas amostrais.

Adicionalmente, o responsável por cada lavoura foi questionado em relação à utilização de herbicidas, aos tratamentos culturais, a origem das sementes, e a presença de fatores de imigração (Apêndice 2). As coordenadas geográficas dos locais de coleta foram obtidas utilizando-se um equipamento GPS (*Global Positioning System*) (Tabela 6).

TABELA 6. Origem geográfica de 27 populações de arroz vermelho coletadas no RS. Porto Alegre, RS. 2010.

População	Local	Coordenadas	
2	Arroio Grande 1	32°13'00"S	53°00'36"O
5	Arroio Grande 2	31°59'58"S	52°37'36"O
6	Arroio Grande 3	32°24'26"S	52°54'04"O
7	Santa Margarida do Sul 1	29°41'00"S	53°48'00"O
8	Santa Margarida do Sul 2	30°11'22"S	54°06'28"O
9	São Gabriel 1	30°28'55"S	54°29'39"O
10	São Gabriel 2	30°30'01"S	54°23'36"O
11	São Gabriel 3	30°14'15"S	54°21'40"O
12	São Gabriel 4	30°13'04"S	54°33'55"O
13	Cacequi 1	29°57'32"S	54°54'20"O
14	Cacequi 2	29°56'12"S	54°54'33"O
15	Cacequi 3	29°52'03"S	54°46'21"O
16	Cacequi 4	29°53'07"S	54°52'39"O
17	Cacequi 5	29°51'44"S	54°08'02"O
18	Cacequi 6	29°48'44"S	54°01'20"O
20	Santo Antônio da Patrulha 1	29°58'44"S	50°25'50"O
21	Santo Antônio da Patrulha 2	29°55'10"S	50°37'06"O
24	Campo Bom	29°42'06"S	51°02'56"O
25	Manoel Viana 1	29°36'48"S	55°29'04"O
27	Harmonia	29°58'36"S	56°09'46"O
28	Manoel Viana 2	29°33'56"S	55°29'47"O
29	Alegrete	29°22'53"S	55°56'37"O
30	Caverá	29°86'01"S	55°71'27"O
31	Agudo 1	29°45'28"S	52°57'56"O
32	Agudo 2	29°31'16"S	53°18'53"O
33	Agudo 3	29°36'49"S	53°19'14"O
34	Agudo 4	29°49'38"S	53°19'34"O

3.2.2.2 Extração de DNA e amplificação dos marcadores SSR

Sementes de cada amostra foram germinadas em casa-de-vegetação da UFRGS.

Amostras de tecido foliar para extração do DNA genômico foram obtidas quando as

plantas estavam com quatro folhas. A extração foi realizada conforme protocolo descrito no Apêndice 1. Foram utilizados 24 marcadores moleculares SSR marcados com corantes fluorescentes e organizados em quatro painéis conforme descrição apresentada em Borba *et al.* (2009a) (Tabela 7). Estes marcadores foram selecionados com base na sua capacidade informativa como conteúdo de informação polimórfica e número médio de alelos (2009a). Além disso, um teste de desequilíbrio de ligação indicou que estes marcadores são independentes no genoma do arroz.

TABELA 7. Composição dos painéis de 24 marcadores SSR utilizados na caracterização genética de populações de arroz vermelho do RS.

	Marcador SSR	Amplitude alélica (pb)	Fluoróforo	Sequência repetida	Cromossomo
Painel 1	RM204	106-194	HEX	(CT) ₄₄	6
	RM38	246-278	HEX	(GA) ₁₆	8
	4653	80-170	6-FAM	(AAG) ₂₅	12
	OG106	200-250	6-FAM	(CT) ₂₇	9
	RM257	130-192	NED	(CT) ₂₄	9
	RM103	300-350	NED	(GAA) ₅	6
Painel 2	OG44	152-182	HEX	(CT) ₄ -23bp-(CT) ₂₂ -(GT) ₄ -(GC) ₆	3
	RM229	106-131	HEX	(TC) ₁₁ (CT) ₅ C ₃ (CT) ₅	11
	RM171	310-344	6-FAM	(GATG) ₅	10
	RM231	170-196	6-FAM	(CT) ₁₆	3
	RM287	90-140	NED	(GA) ₂₁	11
	RM7	160-195	NED	(GA) ₁₉	3
Painel 3	OG10	40-130	HEX	(CT) ₂₉	9
	RM14	160-120	HEX	(GA) ₁₈	1
	RM210	115-175	6-FAM	(CT) ₂₃	8
	RM222	199-215	6-FAM	(CT) ₁₈	10
	RM309	150-180	NED	(GT) ₁₃	12
	RM253	89-119	NED	(GA) ₂₅	6
Painel 4	RM207	84-158	6-FAM	(CT) ₂₅	2
	RM252	193-277	6-FAM	(CT) ₁₉	4
	RM248	80-104	HEX	(CT) ₂₅	7
	RM263	164-220	HEX	(CT) ₃₄	2
	RM11	123-143	NED	(GA) ₁₇	7
	RM55	200-245	NED	(GA) ₁₇	3

A PCR foi conduzida em um volume final de 5 µL contendo 3 ng de DNA; concentrações otimizadas de cada par de iniciadores *forward* e *reverse* (Borba *et al.*,

2009a); 2,5 µL de Master Mix (QIAGEN Multiplex PCR Kit) e 0,5 µL de Qsolution (QIAGEN Multiplex PCR Kit). As amplificações seguiram 5 min de desnaturação a 94°C, 40 ciclos de 60s a 94°C, 45s a 56°C; 1min a 72° e; 10min a 72°C em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Foi utilizado o padrão ROX 500 (Applied Biosystems) para determinação do tamanho dos fragmentos em cada reação. Os fragmentos foram analisados em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) e os alelos foram identificados através do software GeneMapper™ 3.5 (Applied Biosystems).

3.2.2.3 Análise genética

Foi estimado para cada população e para cada marcador SSR o número médio de alelos, a heterozigosidade esperada, também chamada de diversidade gênica de Nei (1978), a heterozigosidade observada e o *conteúdo de informação polimórfica* (PIC) descrito por Botstein *et al.* (1980), o coeficiente de endogamia e a matriz de distâncias genéticas de Nei (1983) no *software* PowerMaker 3.25 (Liu & Muse, 2005). Estes parâmetros, exceto a matriz de distâncias genéticas, são utilizados para quantificação da diversidade genética dentro de cada população e para a comparação da eficiência dos marcadores moleculares utilizados (Laurentin, 2009).

Com o objetivo de visualizar a distribuição filogenética das populações de arroz vermelho, foi construída a partir da matriz de distâncias genéticas das populações um dendograma baseado no método UPGMA (Unweighted Pair Group Method) usando o *software* MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Este método é frequentemente utilizado para a visualização da relação entre populações em estudos genéticos. O agrupamento das populações é realizado sem considerar eventos evolucionários (Laurentin, 2009). Com o objetivo de visualizar a relação genética entre os indivíduos componentes de cada

população, foi obtida a matriz de distâncias genéticas de Nei (1978) entre pares de indivíduos através do *software* PowerMaker 3.25 (Liu & Muse, 2005). A partir desta matriz foi realizada a análise de componentes principais (ACP) através do *software* GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006). A ACP é uma técnica utilizada para avaliar as causas da variabilidade de um conjunto de dados e ordená-los por importância. A ACP busca a projeção na qual os dados apresentem a melhor representação em termos de mínimos quadrados (Kenkel *et al.*, 2002; Diniz-Filho *et al.*, 2009).

As coordenadas dos locais de coleta, obtidas através do GPS, foram utilizadas na construção de uma matriz de distância geográfica das 27 populações de arroz vermelho. Para a determinação da correlação entre a distância genética e a distância geográfica das populações de arroz vermelho foi realizado o teste de Mantel (Smouse *et al.*, 1986) com o *software* GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006). O teste de Mantel foi desenvolvido para testar a correlação entre matrizes com mesmo número de postos matriciais, ou seja, necessitam ter o mesmo número de linhas e colunas (Mantel, 1967). A significância do teste é obtida através de permutações (Smouse *et al.*, 1986), que no caso do presente estudo foram de 9999.

Os dados foram submetidos à análise da variância molecular (AMOVA) pelo *software* Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Esta análise particiona a diversidade genética dentro e entre populações. Dessa forma, é possível determinar se a diversidade genética observada é devida principalmente à variação dentro das populações ou entre as populações (Excoffier *et al.*, 1992). Nesta metodologia, a matriz de distância entre os pares de genótipos é utilizada em um esquema de análise de variância produzindo estimativas de componentes de variância equivalentes às estatísticas F de Wright (Laurentin, 2009). A principal diferença desta para a análise de variância convencional é como a significância dos componentes é testada (Laurentin, 2009). Em análise de

variância convencional a distribuição normal é assumida, entretanto, em dados moleculares isso não ocorre, e por isso são usadas permutações para testar o valor do F_{ST} (Excoffier *et al.*, 1992).

A presença de estruturação entre as 27 populações de arroz vermelho foi determinada pelo *software* Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003). O Structure utiliza inferência bayesiana para examinar o agrupamento de indivíduos baseado no desequilíbrio de ligação entre os marcadores e diferenças nas frequências alélicas nos *loci* testados (Pritchard *et al.*, 2000). Assim, cada indivíduo é atribuído a uma população K, sendo K desconhecido. O modelo utilizado baseou-se em ancestralidade múltipla (Admixture) e frequências alélicas correlacionadas. Foram realizadas cinco rodadas independentes por K variando de 1 a 10, 15 000 gerações *burn in* e 100 000 permutações em simulação randômica MCMC (Markov *chain* Monte Carlo). Para definir qual valor ótimo de K para o conjunto de dados, foi utilizada a estatística *ad hoc*, DeltaK, baseada na taxa de mudança do logaritmo da probabilidade dos resultados entre sucessivos valores de K conforme proposto por Evanno *et al.* (2005).

3.2.2.4 Análise fenotípica da resistência aos herbicidas imidazolinonas

Todas as populações de arroz vermelho foram fenotipadas quanto à resistência ao herbicida imazethapyr. Para tanto, as sementes de todos os indivíduos foram germinadas em câmaras de germinação e posteriormente transplantadas para vasos de 300 ml contendo solo como substrato. Quando as plantas alcançaram estágio V4 foram aspergidas com o herbicida conforme descrito antes no item 3.2.1.4. Avaliou-se a fitotoxicidade causada pelo herbicida sobre cada planta aos 35 dias após aspersão do herbicida (DAA). Utilizou-se escala visual de fitotoxicidade na qual as plantas sem

sintomas receberam valor zero e as plantas totalmente controladas receberam valor 100. Considerando-se como baixo nível de resistência quando as plantas apresentaram mais de 85% de folhas cloróticas e paralisação total do crescimento, médio nível de resistência quando apresentaram de 15-84 % de folhas cloróticas e redução parcial no crescimento e alto nível de resistência quando apresentaram menos de 15% de folhas cloróticas e nenhuma paralisação de crescimento. Dois biótipos de arroz vermelho, um resistente e outro suscetível ao imazethapyr, foram usados como controle positivo e negativo respectivamente. O controle por população foi obtido pela média dos indivíduos de cada população, no caso dos biótipos usados como controle foram avaliadas 15 plantas para obtenção da média.

3.3 Adaptação de cultivares de arroz resistentes às imidazolinonas

A alteração da adaptação decorrente dos processos envolvidos na resistência aos herbicidas inibidores da ALS foi realizada através da avaliação do padrão de germinação de sementes de cultivares de arroz.

3.3.1 Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS. Foram utilizadas cultivares resistentes aos herbicidas do grupo das imidazolinonas IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL e ainda a cultivar IRGA 417 que é suscetível a este grupo de herbicidas. As amostras de sementes das cultivares foram obtidas de distintas propriedades comerciais de sementes arroz do RS, totalizando cinco lotes de cada cultivar. As sementes foram coletadas em unidades de beneficiamento de sementes (UBS), aproximadamente 30 dias após a colheita no campo. Previamente à realização do ensaio foi realizada avaliação do

percentual de germinação das sementes de cada lote com o objetivo de obter homogeneidade na quantidade de sementes viáveis a serem utilizadas.

3.3.2 Primeiro experimento

O primeiro experimento foi conduzido para identificação da faixa de temperatura ideal para avaliação do padrão de germinação das cultivares de arroz em função do tempo. Neste experimento as temperaturas testadas foram 15, 20, 25 e 30°C. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em um esquema fatorial com cinco repetições. O fator A foram as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL e o fator B foram as temperaturas supracitadas. Apenas um lote de sementes de cada cultivar foi utilizado. Cada unidade experimental foi constituída de 100 sementes viáveis obtidas corrigindo-se pelo poder germinativo de cada lote. As sementes foram acondicionadas em uma folha de papel germinador sob a forma de rolo e umedecidas com água destilada posicionada verticalmente no interior de copo tipo Becker com capacidade para 2000 mL. A umidade dos rolos foi mantida por subirrigação, conservando-se uma lâmina de água destilada com aproximadamente 20 mm no interior dos recipientes.

As avaliações ocorreram em intervalos de aproximadamente 12 horas durante oito dias, a partir da primeira avaliação que ocorreu 24 horas após instalação do ensaio. Os rolos foram abertos para a contagem do número de sementes germinadas e o critério adotado para definição da germinação das sementes foi a emergência da radícula ≥ 1 mm de comprimento (FIGURA 6). Em cada avaliação, foram retiradas as sementes germinadas para evitar recontagens errôneas posteriores. Para cada tratamento, foi calculado o percentual cumulativo de sementes germinadas por época de avaliação (Maguire, 1962).



FIGURA 6. Semente de arroz vermelho (esquerda) e arroz (direita) em processo de germinação. A germinação foi considerada quando a radícula alcançou 1 mm de comprimento.

3.3.3 Segundo experimento

Baseado nos resultados do primeiro experimento optou-se por realizar a avaliação dos lotes nas temperaturas de 20 e 25°C. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em um esquema fatorial com cinco repetições. Nesta etapa foram usados todos os cinco lotes de cada cultivar. Assim, o fator A foram as cultivares IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL, Sator CL e IRGA 417; o fator B foram os lotes e o fator C as temperaturas. Cada unidade experimental foi constituída de 100 sementes viáveis. A exposição à germinação, o intervalo de avaliações e a forma de avaliação foram realizadas conforme descrito anteriormente. Os dados, expressos em porcentagem, foram transformados em $\text{sen}^{-1}(x/100)^{1/2}$ com o objetivo de atender as premissas de heterocedasticidade e normalidade da ANOVA. Posteriormente, os dados foram analisados através da ANOVA com modelo misto em cada época de avaliação, no qual cultivar foi o fator fixo e lote o fator aleatório no software SPSS 17 (SPSS Inc., 2008). A generalização dos resultados obtidos por cultivar depende de um correto bloqueamento do efeito de lote, pois os fatores ambientais de cada local de produção teoricamente afetam o vigor das sementes. Posteriormente, foi realizada análise de regressão não linear pelo proc NLIN do software SAS 9.0 (SAS Institute, 2004). A variação da germinação acumulada em função do tempo foi ajustada pelo modelo logístico (Dantigny *et al.*, 2007) mostrado na Equação 4.

EQUAÇÃO 4.
$$Y = \frac{100}{1 + e^{(b_0(b_1 - t))}}$$

Onde Y é a porcentagem de germinação no tempo t , b_0 é referente à inclinação da tangente no ponto de inflexão da curva ou taxa de germinação no ponto de inflexão (TGI), e b_1 é o tempo necessário para alcançar 50% da germinação (G50). A taxa ou velocidade de germinação no ponto b_1 é dada pela Equação 5:

EQUAÇÃO 5.
$$TG = \sqrt{\left[\left(\frac{100 * b_0}{4}\right) - 1\right]}$$

Onde TG é a taxa de germinação no ponto b_1 . Dessa forma, foi calculada a taxa de germinação para cada cultivar (Brown & Mayer, 1988; Dantigny *et al.*, 2007). A comparação destes parâmetros entre os tratamentos foi realizada com base nos intervalos de confiança a 95% (Onofri *et al.*, 2010). Além dos parâmetros descritos acima, foi calculado o *lag phase* (LAG) para cada tratamento. O LAG compreende as fases de embebição e ativação do metabolismo da germinação conhecidas como fase I e fase II da germinação (Bewley, 1997). Na fase I ocorre absorção de água pela semente e a síntese de proteínas a partir de mRNAs conservados. Na fase II ocorre a produção e ativação de enzimas como α -amilase e do fitormônio giberelina. Nessa fase inicia a duplicação do DNA e a síntese de proteínas a partir de novos mRNAs. Na fase III ocorre o alongamento da radícula, que torna-se visível pelo rompimento da casca da semente. Neste experimento, as sementes foram consideradas germinadas quando, na fase III, as radículas alcançaram 1 mm conforme descrito anteriormente (Figura 6). O LAG foi definido quando a germinação acumulada tornou-se diferente de zero estatisticamente pelo intervalo de confiança a 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O manejo de plantas daninhas é fundamental para o alcance do potencial de rendimento de culturas agrícolas. Entretanto, plantas daninhas resistentes a herbicidas são um dos principais entraves para o manejo adequado da cultura. Na cultura do arroz este problema é acentuado pela resistência do arroz vermelho, planta da mesma espécie do arroz cultivado. Neste trabalho buscou-se entender a origem da resistência do arroz vermelho às imidazolinonas, a dinâmica do fluxo gênico entre a cultura e a planta daninha e ainda a possível alteração na adaptação do arroz cultivado resistente àqueles herbicidas.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho espera-se entender como as populações de arroz vermelho evoluem com a continuidade do uso das cultivares resistentes às imidazolinonas ou mesmo cultivares resistentes a outros herbicidas que porventura sejam disponibilizadas comercialmente. Ainda, espera-se contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle de biótipos resistentes e mitigação da evolução da resistência.

4.1 Origem da resistência de arroz vermelho às imidazolinonas

A determinação da origem da resistência de acessos de arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas foi realizada com base em marcadores SSR. Inicialmente, oito marcadores foram selecionados em estudos nos quais se mostraram polimórficos

entre arroz cultivado e arroz vermelho (Rajguru *et al.*, 2005; Brunes *et al.*, 2007; Shivrain *et al.*, 2008; Sundaram *et al.*, 2008; Gealy *et al.*, 2009). Porém, os marcadores RM106, RM180 e RM234 não foram capazes de distinguir polimorfismos entre as cultivares de arroz e o arroz vermelho no presente estudo (Figura 7). Estes marcadores foram utilizados em trabalhos de caracterização genética de populações de arroz vermelho e na identificação de cruzamentos naturais de arroz vermelho e arroz cultivado. O marcador RM106 foi utilizado em um estudo envolvendo populações de arroz vermelho de diversos locais do mundo (Gealy *et al.*, 2009). Entretanto, o número de alelos encontrados foi de apenas cinco em um total de 80 acessos (Gealy *et al.*, 2009). O marcador RM180 foi utilizado para discriminar arroz vermelho, cultivares de arroz dos EUA, incluindo cultivares resistentes aos herbicidas imidazolinonas, e híbridos entre estas plantas (Rajguru *et al.*, 2005; Shivrain *et al.*, 2007). O marcador RM234 também tem sido usado na identificação de híbridos entre arroz cultivado, sobretudo em cultivares resistentes a herbicidas nos EUA (Shivrain *et al.*, 2008; Shivrain *et al.*, 2009a; Shivrain *et al.*, 2009b).



FIGURA 7. Gel de agarose indicando os fragmentos resultantes da amplificação com três marcadores SSR em arroz cultivado e arroz vermelho. Lad, *Ladder* 100 pb (Invitrogen); 422, IRGA 422 CL; AVS, arroz vermelho suscetível; HIB, híbrido artificial obtido de cruzamento entre arroz cultivado IRGA 422 CL e arroz vermelho em casa de vegetação. Porto Alegre, RS. 2010.

Os marcadores 4797, RM251, RM253, RM341 e RM475 apresentaram perfil polimórfico entre o arroz vermelho e as cultivares de arroz no presente estudo

(Figura 8). A genotipagem das plantas de arroz vermelho foi realizada com base nestes marcadores utilizando-se ainda o procedimento *M13 Tail PCR*. Dessa forma, foi adicionada uma sequência de 18pb ao iniciador *forward* de cada marcador. Esta sequência é referente ao marcador universal M13 cuja sequência complementar foi sintetizada contendo o fluoróforo 6-FAM, conforme descrito no item 3.1.2. Nesta etapa, todos estes marcadores exceto o RM253 amplificaram adequadamente os fragmentos SSR correspondentes.

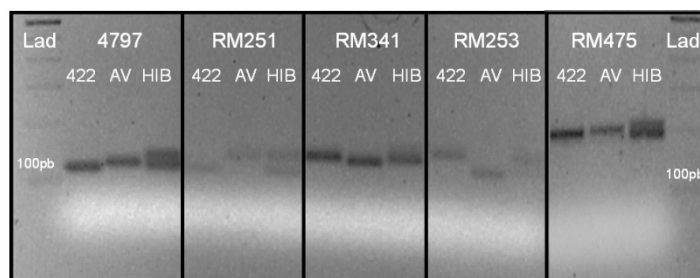


FIGURA 8. Gel de agarose indicando os fragmentos resultantes da amplificação com cinco marcadores SSR em arroz cultivado e arroz vermelho. Lad, *Ladder* 100 pb (Invitrogen); 422, IRGA 422 CL; AVS, arroz vermelho suscetível; HIB, híbrido artificial obtido de cruzamento entre arroz cultivado IRGA 422 CL e arroz vermelho em casa de vegetação. Porto Alegre, RS. 2010.

A Figura 9 ilustra os resultados da amplificação de fragmentos SSR com iniciador marcado com 6-FAM conforme o método *M13 Tail PCR* (Schuelke, 2000). Outros estudos tem utilizado este método na genotipagem de acessos de diversas espécies como milho (Hufford *et al.*, 2011), feijão (Oblessuc *et al.*, 2009), e teca (Fofana *et al.*, 2009), por exemplo. A genotipagem de arroz e arroz vermelho utilizando esse método foi realizada recentemente em populações oriundas da Coreia do Sul (Chung & Park, 2010). Nesses trabalhos, os autores frisam o baixo custo como a principal vantagem deste método, conforme previsto por Schuelke (2000). Esta vantagem refere-se à necessidade de marcação com fluoróforo apenas da sequência iniciadora M13. De outra forma, todas as sequências iniciadoras *forward* deveriam ser

marcadas. A incorporação do fluoróforo aumenta o custo da síntese em aproximadamente 1500% em relação ao custo da síntese de uma sequência iniciadora não marcada. Por outro lado, a inclusão da cauda M13 em uma sequência iniciadora aumenta seu custo em 100%. Por isso, em termos financeiros, a técnica M13 *tail* PCR é vantajosa.

A análise dos fragmentos em analisador automático de DNA comparativamente ao gel de agarose é mais precisa. A precisão obtida com o sequenciador é superior àquela obtida através da agarose comum devido à diferença de resolução de ambos os métodos (Gupta *et al.*, 2010). Géis de agarose comum, em concentrações de 1 a 3%, permitem que sejam detectadas variações em torno de 10 pares de base. Por outro lado, com o analisador automático é possível discriminar alelos com apenas uma base de diferença. Além disso, a presença do padrão ROX em cada reação aumenta a precisão da análise em comparação ao padrão *ladder* utilizado em eletroforese para análise de várias reações. Assim, a discriminação de alelos é melhor através do sequenciador automático, resultando em maior poder discriminatório de indivíduos em comparação ao gel de agarose (Gupta *et al.*, 2010). Ainda, a análise de grande volume de dados, como o do presente estudo, através do sequenciador automático é mais expedita em comparação com a análise em gel de agarose.

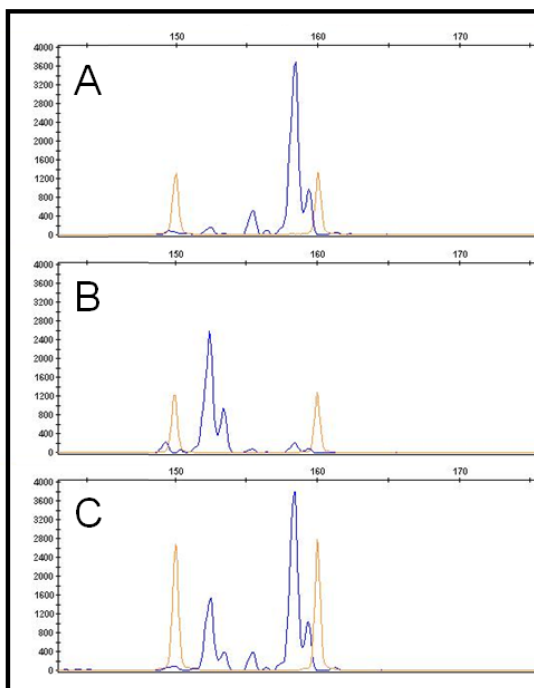


FIGURA 9. Eletroferograma dos fragmentos do marcador RM341 amplificados de IRGA 422 CL (A), arroz vermelho (B) e híbrido artificial obtido em casa de vegetação, utilizando iniciador *foward* com cauda M13. Os picos vermelhos correspondem ao padrão ROX e os azuis correspondem aos alelos amplificados na PCR. Porto Alegre, RS. 2010.

Os marcadores SSR confirmaram os cruzamentos artificiais, que apresentaram os alelos dos respectivos parentais arroz vermelho e cultivar (Tabela 8). Entretanto, foi detectado que o cruzamento da cultivar IRGA 417 com o arroz vermelho não foi bem sucedido, pois os quatro *loci* foram homozigotos, contendo os alelos iguais ao da planta de arroz vermelho (Tabela 8). A cultivar Sator CL é um híbrido e conforme esperado, apresentou heterozigose nos marcadores testados, exceto no marcador 4797 que foi homozigoto (Tabela 8). Isso pode ocorrer no caso de ambas as linhagens parentais desta cultivar possuírem o mesmo alelo para este loci. Com isso, a geração F1 pode ser homozigota em alguns *loci*, de acordo com a herança mendeliana (Slavov *et al.*, 2004; Templeton, 2006a). A cultivar SATOR CL apresentou dois alelos iguais aos da planta de arroz vermelho com a qual foi realizado o cruzamento. Estes alelos ocorreram nos *locus* RM251 e RM475 e assim, o híbrido oriundo do cruzamento destas plantas poderia

ser homocigoto nestes *loci*. De fato, isso ocorreu com o marcador RM251, que foi monomórfico na genotipagem do híbrido entre AV104 e Sator CL (Tabela 8). O mesmo ocorreu com o híbrido de AV120 e PUITÁ INTA CL, que foi homocigoto para o marcador RM475 (Tabela 8).

TABELA 8. Genotipagem de cultivares de arroz, arroz vermelho e híbridos realizados em casa de vegetação, com quatro marcadores SSR. Porto Alegre, RS. 2010.

População ¹	Marcador molecular SSR				Mutação
	4797	RM341	RM251	RM475	
IRGA 422 CL	129/129	157/157	129/129	212/212	Gly ₆₅₄ Glu
AV122	135/135	152/152	151/151	202/202	-
AV122 x IRGA 422 CL	129/135	152/157	129/151	202/212	Gly ₆₅₄ Glu
PUITÁ INTA CL	129/129	187/187	129/129	202/202	Ala ₁₂₂ Thr
AV120	135/135	152/152	147/147	202/202	-
AV120 x PUITÁ INTA CL	129/135	152/187	129/147	202/202	Ala ₁₂₂ Thr
Sator CL	129/129	157/187	129/143	202/212	Ser ₆₅₃ Asn
AV104	135/135	152/152	143/143	202/202	-
AV104 x Sator CL	129/135	152/187	143/143	202/212	Ser ₆₅₃ Asn
IRGA 417	135/135	187/187	129/129	212/212	-
AV110	135/135	152/152	143/143	202/202	-
AV110 x IRGA 417	135/135	152/152	143/143	202/202	-
Arroz vermelho suscetível	129/129	175/175	129/129	202/202	-

¹AV110, AV122, AV120 e AV104 são plantas de arroz vermelho utilizadas nos cruzamentos.

O alto poder discriminante dos marcadores SSR e sua codominância têm sido apontados como umas das suas principais vantagens (Jones *et al.*, 2009). Estas características permitem que estes sejam utilizados em estudos de caracterização genética e de paternidade em diversas espécies (Slavov *et al.*, 2005; Tew & Pan, 2010). Embora não exista um número predeterminado de marcadores a serem usados, estudos têm sido desenvolvidos com quantidades relativamente pequenas de marcadores SSR. Por exemplo, 87 progênies de cana-de-açúcar foram caracterizadas através de sete marcadores SSR, que produziram um total de 51 alelos polimórficos (Tew & Pan, 2010). A partir de três marcadores SSR, foram avaliados 205 acessos de *Brassica rapa* com a finalidade de encontrar fluxo gênico a partir de *B. napus*

(Elling *et al.*, 2010). Na cultura do arroz, trabalhos com o objetivo de identificação de híbridos entre arroz cultivado e arroz vermelho têm sido desenvolvidos utilizando-se cinco (Rajguru *et al.*, 2005), dois (Shivrain *et al.*, 2009a) e somente um marcador SSR (Shivrain *et al.*, 2007). Entretanto, nestes trabalhos envolvendo arroz cultivado e arroz vermelho os autores conheciam em qual geração estavam os indivíduos avaliados. Avaliações de indivíduos de arroz vermelho semelhantes à realizada nesta dissertação não foram encontradas na literatura.

Entre os marcadores polimórficos o conteúdo de informação polimórfico médio de 0,51, variando de 0,35 a 0,77. A diversidade gênica média foi de 0,56, variando de 0,45 a 0,8. A genotipagem dos acessos de arroz vermelho indicou haver muitos alelos compartilhados entre estes e as cultivares de arroz. Isso foi evidenciado na análise de frequências alélicas (Tabela 9). O alelo 129 do marcador 4797 está presente nas cultivares resistentes a imidazolinonas e ausente na cultivar suscetível IRGA 417. Esse alelo está presente em todas as populações avaliadas e com frequências relativamente altas (Tabela 9). O alelo 135 deste marcador foi encontrado na cultivar IRGA 417 e no arroz vermelho utilizados nos cruzamentos (Tabela 8). Assim, esse alelo foi associado a esta cultivar e a suscetibilidade à imidazolinonas. O marcador RM251 indicou o alelo 129 como típico das cultivares de arroz (Tabela 9). Este marcador indicou diversos alelos ausentes nas cultivares, sendo considerados típicos de arroz vermelho (Tabela 9). Os alelos 157 e 187 encontrados no locus RM341 foram considerados típicos das cultivares de arroz avaliadas. Esses alelos estão presentes na cultivar Sator CL em heterozigose (Tabela 8). No *locus* RM475 o alelo 202 foi observado em homozigose na cultivar PUITÁ INTA CL, enquanto que nas cultivares IRGA 417 e IRGA 422 CL o alelo observado foi 212. O alelo 216 foi considerado típico de arroz vermelho, devido sua ausência nas cultivares avaliadas. Entre todos os acessos genotipados houve

somente dois alelos privados. O alelo 175 do *locus* RM341 encontrado no arroz vermelho suscetível e o alelo 153 de um acesso da população São Martinho da Serra 1 observado no *locus* RM251 (Tabela 9).

TABELA 9. Frequências alélicas de acessos de arroz vermelho e cultivares de arroz, obtidas pela genotipagem de quatro marcadores SSR. Porto Alegre, RS. 2010.

População	----4797----		-----RM251-----							-----RM341-----					-----RM475-----			
	129	135	129	134	139	143	147	151	153	163	152	155	157	175	187	202	212	216
IRGA 417	-	1,00	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	1,00	-
I 422 CL	1,00	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-
P INTA CL	1,00	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	1,00	-	-
Sator CL	1,00	-	0,50	-	-	0,50	-	-	-	-	-	-	0,50	-	0,50	0,50	0,50	-
AVS	0,28	0,72	0,22	-	-	0,44	0,17	0,17	-	-	0,67	-	0,06	0,11	0,17	0,89	0,11	-
C Sul	0,60	0,40	0,53	0,17	-	-	0,23	0,07	-	-	0,04	0,08	0,88	-	-	-	0,85	0,15
SM Serra 1	0,83	0,17	0,25	0,25	-	0,08	0,08	0,17	0,08	0,08	0,04	0,08	0,83	-	0,04	-	0,73	0,27
SM Serra 2	0,67	0,33	0,20	0,20	-	-	0,40	0,20	-	-	0,20	-	0,80	-	-	-	0,67	0,33
S Maria 1	0,63	0,37	0,50	0,04	-	-	-	0,46	-	-	0,20	0,07	0,60	-	0,13	0,04	0,35	0,62
S Maria 2	0,46	0,54	0,77	0,12	-	-	-	0,12	-	-	0,21	-	0,75	-	0,04	-	0,75	0,25
R Seca	1,00	-	0,50	0,08	-	0,25	-	-	-	0,17	-	-	0,23	-	0,77	0,15	0,62	0,23
São Gabriel	0,77	0,23	-	-	0,04	0,46	0,29	-	-	0,21	0,14	0,14	0,73	-	-	0,83	-	0,17
N Cabrais	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	0,75	-	0,25	-	1,00	-
D Francisca	0,80	0,20	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	0,40	-	0,60	-	1,00	-
R Sul 1	0,71	0,29	0,29	0,43	-	0,14	-	-	-	0,14	-	0,13	0,88	-	-	-	0,70	0,30
S Sul 2	0,67	0,33	0,15	0,31	-	0,15	0,08	0,08	-	0,23	0,07	-	0,93	-	-	0,13	0,46	0,42
Camaquã	0,85	0,15	0,17	0,44	-	0,06	0,06	0,28	-	-	0,05	-	0,95	-	-	0,05	0,85	0,10
Uruguiana	0,43	0,57	0,30	0,40	-	0,10	-	0,10	-	0,10	-	-	1,00	-	-	0,04	0,96	-
Agudo	0,50	0,50	-	0,75	-	0,25	-	-	-	-	-	-	0,87	-	0,13	0,35	0,30	0,35
Alegrete	0,56	0,44	-	0,33	-	0,56	0,11	-	-	-	0,05	-	0,80	-	0,15	-	0,83	0,17

A resistência aos herbicidas imidazolinonas em arroz vermelho pode ser devida ao fluxo gênico entre cultivares de arroz resistentes e arroz vermelho ou seleção independente de fluxo gênico através de uso contínuo desses herbicidas (Kuk *et al.*, 2008; Shivrain *et al.*, 2009b). Os acessos analisados no presente estudo foram coletados em lavouras de arroz na safra 2007/2008 e foram fenotipados em relação à resistência aos herbicidas imidazolinonas (Menezes *et al.*, 2009). Posteriormente, foram detectadas as mutações no gene da ALS nestes acessos (Roso *et al.*, 2010a). Tanto as informações obtidas da fenotipagem quanto da genotipagem dos acessos de arroz vermelho foram utilizadas para diagnosticar a origem da resistência dos mesmos. Entretanto, a presença de alelos comuns entre as plantas de

arroz vermelho e as cultivares de arroz foi um fator negativo ao diagnóstico da resistência por seleção independente. Isso é devido à impossibilidade de reconhecimento da herança de alelos em homozigose. Outro fator limitante desse diagnóstico é a ocorrência de *loci* homozigotos e heterozigotos no mesmo indivíduo. Isso é devido à decorrência de gerações subsequentes de autofecundação característica do gênero *Oryza*. A autofecundação faz com que a heterozigose diminua 50% a cada geração (Lange, 2003).

A origem da resistência do arroz vermelho quanto à seleção independente foi determinado pela ausência de alelos semelhantes aos das cultivares resistentes a imidazolinonas IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL. Este método é uma adaptação do método de paternidade por exclusão, no qual os indivíduos testados são avaliados quanto à existência ou não de alelos de possíveis genitores (Slavov *et al.*, 2005). Foram identificados dois indivíduos cuja resistência aos herbicidas imidazolinonas foi originada da seleção independente de fluxo gênico e 174 cuja resistência foi devida a fluxo gênico (Tabela 10). Em termos proporcionais, isto corresponde que 1,1% dos indivíduos testados foram identificados como resistentes por seleção independente e 98,9% foram resistentes devido ao fluxo gênico (Tabela 10).

TABELA 10. Origem da resistência de arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas do RS. Porto Alegre, RS. 2010.

Origem da resistência	Indivíduos avaliados	Indivíduos identificados	Proporção (%)
Seleção independente	176	2	1,1
Fluxo gênico	176	174	98,9

Dentre os indivíduos cuja resistência foi devida ao fluxo gênico, dois apresentaram todos os *loci* heterozigotos, um da população São Martinho da Serra 1 e outro da população Santa Maria 1 (Apêndice 3). Estes indivíduos contêm alelos típicos de arroz vermelho e da cultivar IRGA 422 CL, além da mutação Gly₆₅₄Glu, o que indica

que estes indivíduos possam ser a geração F1 de um evento de fluxo gênico ocorrido em lavoura.

Indivíduos da população Restinga Seca e São Gabriel, portadores da mutação Ser₆₅₃Asn, possuem os alelos presentes na cultivar Sator CL que também possui esta mutação (Apêndice 3). Isto evidencia a ocorrência de fluxo gênico a partir desta cultivar para o arroz vermelho. Ainda, indivíduos da população Restinga Seca, portadores da mutação Ala₁₂₂Thr, apresentaram alguns alelos iguais aos que ocorrem em PUITÁ INTA CL que contém a mesma mutação (Apêndice 3). Entretanto, estes alelos também pertencem à cultivar IRGA 417 e assim, não é possível definir, com um mínimo de confiabilidade, que a presença desta mutação nestes acessos seja devida ao fluxo gênico a partir de PUITÁ INTA CL. Um fato complicador é que o histórico de uso de cultivares nos locais onde foram coletados os indivíduos de arroz vermelho indica que não houve cultivo tanto de Sator CL quanto de PUITÁ INTA CL anteriormente à coleta dos acessos, realizado na safra 2007/2008 (Kalsing, A., comunicação pessoal). Além disso, o cultivo comercial da cultivar PUITÁ INTA CL foi liberado somente no ano de 2008/2009 no Brasil (MAPA, 2011).

Assim, a partir dessas informações duas possibilidades podem ter ocorrido. Uma delas é a ocorrência natural destas mutações nestes materiais. É conhecido que existem 22 mutações no gene da ALS que conferem resistência aos herbicidas inibidores de ALS em plantas daninhas (Powles & Yu, 2010). Foram identificadas até o momento seis espécies de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores de ALS cuja mutação é Ala₁₂₂Thr (Roso *et al.*, 2010a; Tanel *et al.*, 2011). Além disso, duas espécies resistentes a estes herbicidas foram identificadas portando a mutação Ser₆₅₃Asn (Tranel *et al.* 2011), presente na cultivar Sator CL. Em plantas de arroz vermelho, estas mutações foram identificadas por Roso *et al.* (2010a), sendo sua origem ainda

desconhecida. Os resultados apresentados aqui não permitem concluir que os acessos de arroz vermelho portadores das mutações Ala₁₂₂Thr e Ser₆₅₃Asn tenham adquirido-as naturalmente. Esta limitação é devida em parte à presença de alelos semelhantes na cultivar IRGA 417 que são compartilhados com as demais cultivares e dificultam a definição do genitor. O número reduzido de marcadores utilizados também contribuiu para insuficiente discriminação das cultivares. Estudos posteriores devem ser realizados com mais marcadores a fim de aumentar o poder de discriminação entre cultivares e os acessos. Outra possibilidade é que estas cultivares tenham sido utilizadas em certas áreas, no caso de Sator CL, mas a informação oficial tenha se perdido. No caso da cultivar PUITÁ INTA CL, o uso pode ter sido realizado com sementes oriundas da Argentina, onde o cultivo comercial foi liberado anteriormente em relação ao Brasil. Entretanto, estas hipóteses carecem de informações conclusivas e requerem estudos mais detalhados. Por outro lado, a mutação Gly₆₅₄Glu, presente na cultivar IRGA 422 CL, ocorreu naturalmente em uma população de arroz vermelho do Arkansas (Sales *et al.*, 2008). Esta informação foi obtida no presente estudo para populações de arroz vermelho do RS. Os dois indivíduos cuja resistência foi devida à seleção independente pertencem às populações São Martinho da Serra 1 e São Martinho da Serra 2 (Apêndice 3). A mutação no gene da ALS encontradas nestes indivíduos é a Gly₆₅₄Glu, à semelhança da que foi encontrada nos EUA (Sales *et al.*, 2008).

Os resultados encontrados neste estudo indicam que o fluxo gênico a partir de plantas de arroz resistentes é o fator preponderante na evolução da resistência de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas no RS. Isso é esperado devido à maior probabilidade de ocorrência de fecundação cruzada entre plantas de arroz em comparação com a probabilidade de ocorrência de mutação no gene ALS. A frequência inicial de mutação no gene da ALS é estimada em 10^{-6} (Delye *et al.*, 2009). Esta

informação explica o porquê da rápida evolução de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores de ALS (Preston & Powles, 2002; Delye *et al.*, 2009). Por outro lado, em culturas como o arroz que possuem espécies correlatas como plantas daninhas, o fluxo gênico entre estas plantas pode ser mais importante que as mutações naturais na evolução da resistência a herbicidas, conforme comprovado por este estudo. Para ilustrar este fato, foi realizada uma comparação entre ambas as origens de resistência aos herbicidas inibidores de ALS (Tabela 11). Nesta comparação foram utilizados resultados médios de pesquisa e os fatores que afetam ambos os casos não foram considerados por fins didáticos. Por exemplo, tomando por base a área de 1 ha com uma infestação de arroz vermelho de 15 plantas/m² (IRGA, 2010), o que resulta em 15000 plantas/ha, e uma produção de 1000 sementes/planta (Hamid *et al.*, 2007), e numa frequência inicial de mutação da ordem de 10⁻⁶ (Delye *et al.*, 2009), haveria uma produção esperada de 1500 indivíduos resistentes em 1 ha (Tabela 11). Em relação ao fluxo gênico, a probabilidade de ocorrência utilizada para comparação foi a obtida no experimento discutido posteriormente no item 4.2 (Tabela 11). Com base nessa probabilidade, seriam esperados 36450 indivíduos resistentes em 1 ha. A razão entre o número de indivíduos resistentes esperados devido a cada forma de origem seria de 0,041. Esta razão calculada com os dados observados neste experimento é de 0,048 (Tabela 11). Esse cenário ilustra e explica a diferença de magnitude encontrada entre o número de indivíduos resistentes a imidazolinonas por seleção independente e fluxo gênico obtidos no presente estudo. Além disso, este resultado indica que a metodologia empregada está de acordo com o que é esperado baseado em resultados da literatura.

A diferença proporcional entre processos de seleção independente e fluxo gênico em arroz foi apontada por Gressel e Valverde (2009). Estes autores argumentaram que

devido às probabilidades de ocorrência de cada fator é esperado que a resistência de arroz vermelho devida ao fluxo gênico ocorra em 99% dos casos. Além da confirmação desta hipótese pelo presente estudo, outros trabalhos apresentaram resultados semelhantes na Costa Rica (Gressel & Valverde, 2009) e nos EUA (Shivrain et al, 2006).

TABELA 11. Razão entre número de indivíduos resistentes devido à seleção independente e fluxo gênico observados neste estudo e esperados em 1 ha a partir de dados da literatura. Porto Alegre, RS. 2010.

Origem da resistência	Probabilidade de ocorrência	Plantas/ha	Sementes/planta	Indivíduos resistentes esperados	Indivíduos resistentes observados
Seleção independente	0,000010	150000	1000	1500	2
Fluxo gênico	0,000344	150000	1000	51600	174
			Razão	0,029	0,011

A resistência aos herbicidas imidazolinonas em arroz vermelho devido ao fluxo gênico pode ocorrer a partir das cultivares de arroz resistente e também a partir de plantas de arroz vermelho resistentes, conforme resultados obtidos neste trabalho e discutido no item 4.2.1 desta dissertação. Isso explica, por exemplo, a ocorrência de heterozigose em alguns *loci* e homozigose em outros em um mesmo indivíduo (Apêndice 3). O fluxo gênico entre plantas de arroz vermelho pode gerar indivíduos suscetíveis no caso de genitores resistentes serem heterozigotos no alelo mutante. Isso é possível devido ao fato de a resistência aos inibidores de ALS resultante de local de ação alterado ser regida por dois alelos em relação de dominância (Shivrain *et al.*, 2006). Assim, de acordo com a herança mendeliana, parte da progênie será composta por indivíduos suscetíveis aos herbicidas (Templeton, 2006a). Entretanto, a aplicação posterior dos herbicidas imidazolinonas elimina indivíduos suscetíveis. Isso foi estudado em relação ao fluxo gênico entre arroz cultivado resistente ao herbicida glufosinato de amônio e plantas de arroz vermelho (Oard *et al.*, 2000). Os autores

mostraram que a resistência a este herbicida, conferida pelo gene BAR, é controlada por dois alelos e segue a segregação mendeliana.

Em populações de plantas daninhas resistentes os alelos mutantes que conferem resistência aos herbicidas podem persistir ao longo do tempo (Ellstrand *et al.*, 1999). Isso é provável que ocorra na medida em que os mesmos herbicidas continuem a ser utilizados. A seleção imposta às plantas pela aplicação destes produtos é alta, uma vez que a maioria dos indivíduos suscetíveis é eliminada após uma aplicação. Assim, plantas de arroz vermelho resistentes as imidazolinonas seja através de seleção independente ou fluxo gênico poderão manter nas populações os alelos de resistência. Cabe salientar que mesmo mutações ocorridas naturalmente podem ser transmitidas através de fluxo gênico de pólen entre plantas, ou de sementes entre populações. Por outro lado, mesmo com interrupção do uso de herbicidas imidazolinonas em locais contendo plantas de arroz vermelho resistentes, a frequência dos alelos mutantes pode não diminuir ao longo do tempo. Isso ocorre porque algumas mutações ocorridas no gene da ALS provocam alterações positivas na adaptação das plantas portadoras (Park *et al.*, 2004), além da resistência a estes herbicidas (Menezes *et al.*, 2009). Isso foi comprovado em diversas espécies de plantas daninhas e será discutido com maiores detalhes no item 4.3 juntamente com os resultados que indicam alteração positiva na adaptação de plantas de arroz resistentes às imidazolinonas. Estas considerações indicam que o controle de escapes de arroz vermelho deve ser uma regra fundamental em programas de manejo dessa planta daninha em lavouras de arroz.

A persistência de alelos mutantes conferindo resistência aos herbicidas foi estudada na espécie *B. rapa* (Warwick *et al.*, 2003; Warwick *et al.*, 2008). Após quatro anos da detecção de híbridos entre nabo e *B. rapa* no Canadá (Warwick *et al.*, 2003), foi detectado o transgene de resistência ao herbicida glyphosate e indivíduos de *B. rapa*

(Warwick *et al.*, 2008). Em outro estudo, realizado nos EUA, a persistência de alelos de cultivares de *R. sativus* em *R. raphanistrum* foi monitorada durante dez anos (Snow *et al.*, 2010). Neste trabalho confirmou-se que os alelos examinados persistiram em todas as populações de *R. raphanistrum* avaliadas, e que as frequências alélicas variaram entre *loci*, populações e anos (Snow *et al.*, 2010). Os resultados destes estudos alicerçam a hipótese de que alelos mutantes, oriundos de cultivares ou de plantas resistentes podem persistir em populações de plantas daninhas.

O arroz vermelho é a planta daninha de mais difícil controle na cultura do arroz, principalmente devido à sua similaridade genética com o arroz cultivado (Santos *et al.*, 2007). Entretanto, características como a degrane e dormência nas sementes do arroz vermelho agravam o problema, pois além de não serem colhidas, as sementes caídas no solo persistem por anos até germinarem em momento oportuno (Finkelstein *et al.*, 2008; Thurber *et al.*, 2010). Os resultados obtidos neste estudo trazem novas informações que complementam os dados de infestação e resistência de arroz vermelho na cultura do arroz. Isso porque estas informações tomadas conjuntamente deverão ser utilizadas no desenvolvimento de estratégias de controle dessa planta daninha. Com a evolução de populações de arroz vermelho resistentes às imidazolinonas (Menezes *et al.*, 2009), o controle químico com estes herbicidas passa a ser limitado e dessa forma, outras práticas de manejo devem ser utilizadas mais enfaticamente.

Anteriormente não era conhecida a origem da resistência do arroz vermelho às imidazolinonas no RS. A determinação da predominância e da magnitude destes processos obtidas neste estudo é importante, pois indica a necessidade de intensificação de estratégias de prevenção e manejo da resistência do arroz vermelho aos herbicidas. Considerando a ocorrência de resistência aos herbicidas em arroz vermelho devida à

seleção independente de mutantes e posterior fluxo gênico para plantas vizinhas, o manejo deve ser realizado com base na redução da pressão de seleção pelos herbicidas. Isso é alcançado através da rotação de culturas que permite a utilização de herbicidas de distintos mecanismos de ação (Andres, *et al.*, 2001; Burgos *et al.*, 2008). Por outro lado, considerando-se a resistência de arroz vermelho originada devido ao fluxo gênico direto de cultivares resistentes aos herbicidas, as estratégias de controle devem ser baseadas no controle de escapes de arroz vermelho. Para tanto, práticas como *rouging* ou catação manual e aplicação de herbicidas durante o florescimento do arroz vermelho podem ser utilizadas (Agostinetto *et al.*, 2001). Além de práticas convencionais de controle do arroz vermelho resistentes aos herbicidas imidazolinonas, algumas estratégias baseadas em biotecnologia vêm sendo propostas para mitigar o fluxo gênico ou impedir a introgressão dos alelos de resistência em populações desta planta daninha (Gressel, 1999; Al-Ahmad & Gressel, 2006; Lin *et al.*, 2008; Gressel & Valverde, 2009). Estas estratégias serão discutidas detalhadamente no item 4.2.2 juntamente com os resultados do estudo de fluxo gênico entre populações de arroz vermelho.

4.2 Quantificação do fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente e entre populações de arroz vermelho resistente do RS

4.2.1 Fluxo gênico a partir de arroz vermelho resistente

A produtividade de sementes estimada no experimento foi de 6300 kg/ha para IRGA 417 e de 3200 kg/ha para o arroz vermelho em uma área de 1568 m². Em decorrência do fenômeno meteorológico El Niño no ano agrícola 2009/2010 a semeadura do experimento foi realizada em dezembro, um mês após a época de

semeadura recomendada. Além disso, este fenômeno causa excesso de chuva e consequente nebulosidade excessiva na Região Sul do Brasil, o que limita o potencial produtivo do arroz (Berlato & Fontana, 2003). A detecção de indivíduos resistentes à imidazolinonas originados por fecundação cruzada foi avaliada em aproximadamente 1 024 000 sementes. Este número decorre da amostragem de 1989 sementes por determinação, conforme procedimento descrito por Mcpherson *et al.* (2009) e Jhala *et al.* (2010) e mostrado na Tabela 4, multiplicado por 512 amostras coletadas no experimento. No somatório dos tratamentos foram encontradas 249 plantas resistentes, o que resultou em uma taxa de fluxo gênico de 0,0243%.

A avaliação do fluxo gênico de arroz foi realizada considerando as cultivares resistentes à imidazolinonas IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL como doadoras de pólen (doadoras), e a cultivar IRGA 417 e um biótipo de arroz vermelho suscetível aos herbicidas imidazolinonas foram os receptoras de pólen (receptoras). O marcador fenotípico a ser detectado nas plantas híbridas foi a resistência às imidazolinonas. A Figura 10 ilustra as etapas de bioensaios de sementes e aplicação do herbicida para eliminação dos falsos positivos.

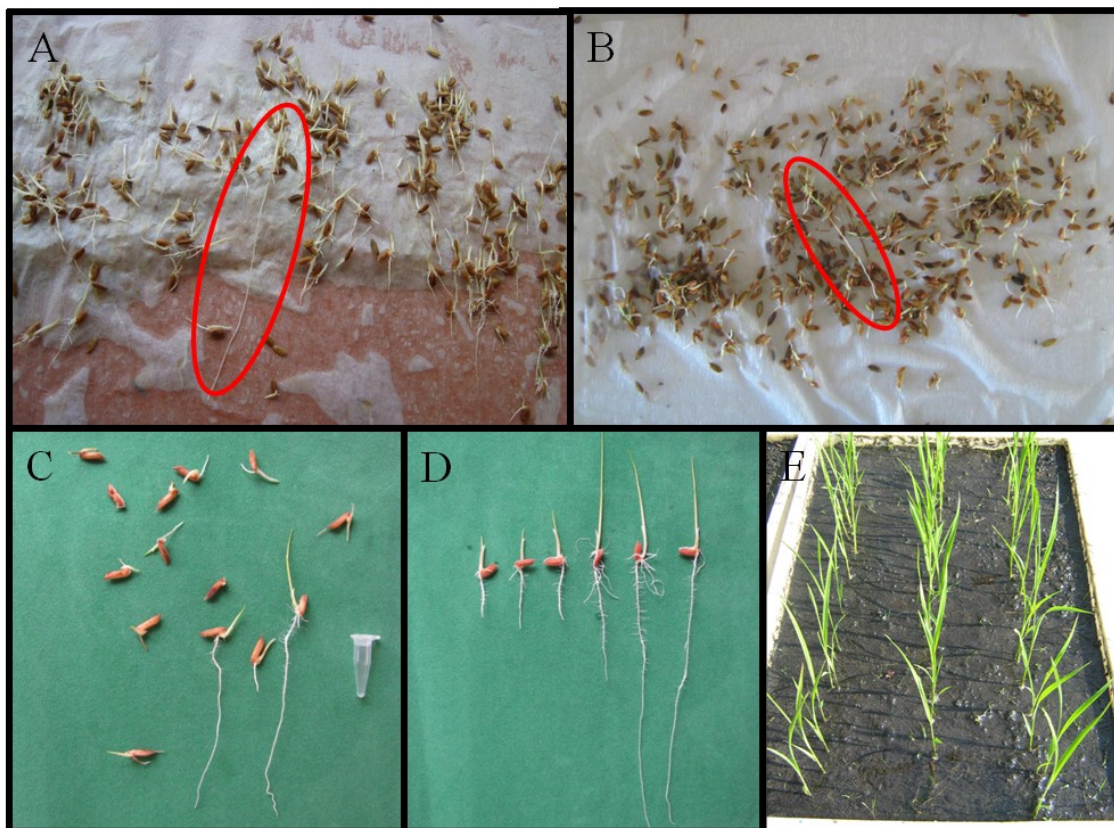


FIGURA 10. Etapas da detecção dos híbridos entre arroz resistente a imidazolinonas e arroz suscetível. A) híbrido entre IRGA 417 e PUITÁ INTA CL. B) híbrido entre arroz vermelho suscetível e IRGA 422 CL. C) Detalhe comparativo entre sementes de IRGA 417 e híbridos resistentes. D) Detalhe comparativo entre arroz vermelho suscetível e híbridos resistentes. E) Estádio no qual as plantas híbridas foram aspergidas com o herbicida imazethapyr. Porto Alegre, RS. 2010.

A tríade composta pelos métodos bioensaio de embebição com solução herbicida, aspersão do herbicida e marcadores moleculares SNP se mostrou eficaz na eliminação de falsos positivos. Algumas plântulas suscetíveis, sobretudo de arroz vermelho, apresentaram comprimento de raiz semelhante ao das testemunhas resistentes no bioensaio e foram nomeadas resistentes. Entretanto, o herbicida imazethapyr aplicado causou a morte das mesmas, aumentando a precisão do método de detecção. Foi observado que as plântulas de IRGA 417 são mais suscetíveis ao herbicida imazethapyr se comparadas às de arroz vermelho suscetível, assim, os falsos positivos destas cultivar foram raros neste experimento. Das plântulas remanescentes foram selecionadas ao acaso quatro repetições por combinação doador x receptor para

identificação das mutações através dos os marcadores moleculares SNP descritos anteriormente no item 3.2.1.4. As mutações observadas indicam que as plântulas de arroz vermelho (Figura 11) e de IRGA 417 (Figura 12) são híbridas oriundas de fluxo gênico entre estas e o arroz vermelho resistente e as cultivares IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL.

Os dados de fluxo gênico expressos em porcentagem não tiveram distribuição normal nem variâncias homocedásticas devido à baixa amplitude numérica das observações e grande quantidade de valores iguais à zero. Desta forma, as pressuposições de normalidade e homocedasticidade, necessárias para realização da análise de variância paramétrica, não foram atendidas. Diversas transformações foram realizadas sem que a correção destes problemas fosse alcançada. Por isso, foram adotados métodos de análise de variância não paramétrica.

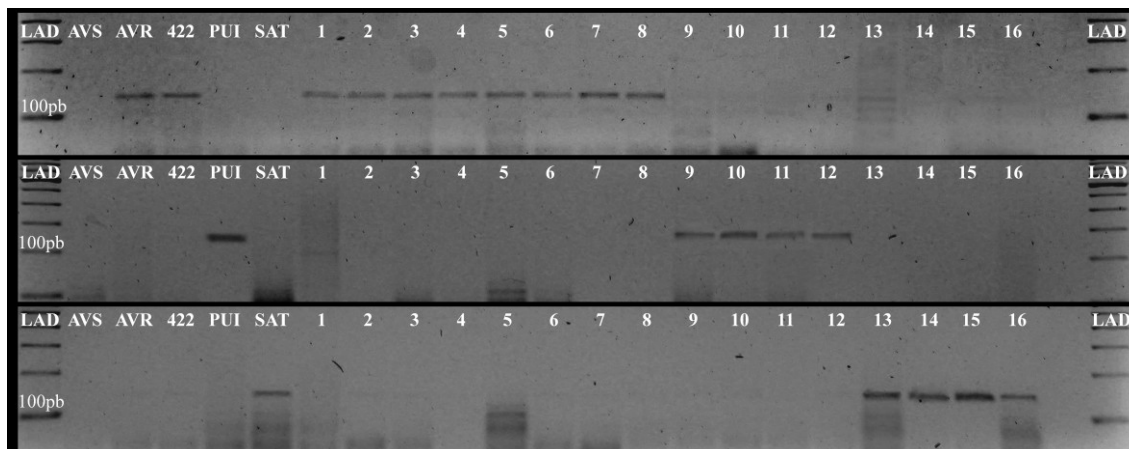


FIGURA 11. Gel de agarose indicando os fragmentos SNP do arroz vermelho suscetível a imidazolinonas (AVS) utilizado como receptor de pólen, das cultivares IRGA 422 CL (422), PUITÁ INTA CL (PUI) e Sator CL (SAT) utilizadas como doadores de pólen e de indivíduos híbridos AVS x AVR (linhas 1, 2, 3 e 4), AVS x 422 (5, 6, 7 e 8), AVS x PUI (9, 10, 11 e 12) e AVS x SAT (13, 14, 15 e 16). LAD, Ladder 100 pb (Invitrogen). Acima, foi testada a presença da mutação Gly₆₅₄Glu de IRGA 422 CL e do arroz vermelho resistente. No centro, foi testada a presença da mutação Ala₁₂₂Thr de PUITÁ INTA CL. Abaixo, foi testada a mutação Ser₆₅₃Asp de Sator CL. Porto Alegre, RS. 2010.

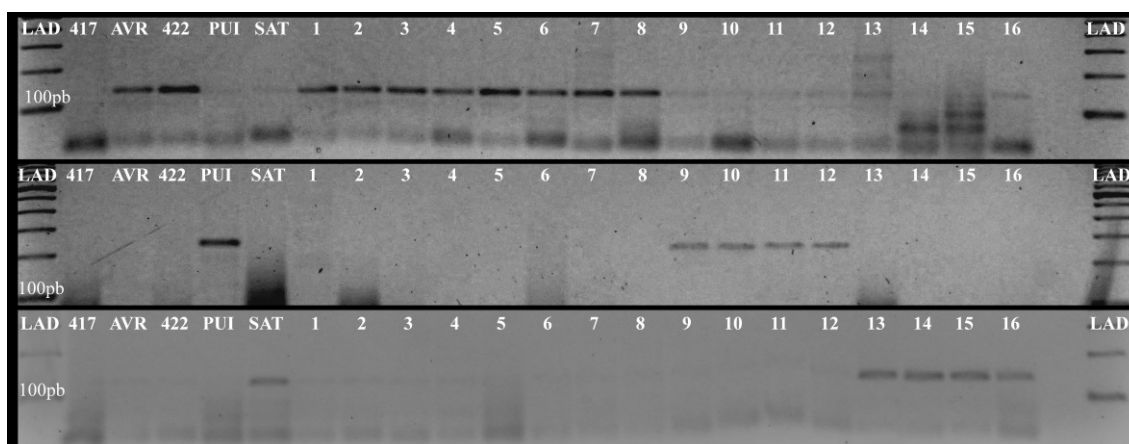


FIGURA 12. Gel de agarose indicando os fragmentos SNP da cultivar IRGA 417 (417) utilizada como receptor de pólen, das cultivares IRGA 422 CL (422), PUITÁ INTA CL (PUI) e Sator CL (SAT) utilizadas como doadoras de pólen e de indivíduos híbridos 417 x AVR (linhas 1, 2, 3 e 4), 417 x 422 (5, 6, 7 e 8), 417 x PUI (9, 10, 11 e 12) e 417 x SAT (13, 14, 15 e 16). LAD, Ladder 100 pb (Invitrogen) Acima, foi testada a presença da mutação Gly654Glu de IRGA 422 CL e do arroz vermelho resistente. No centro, foi testada a presença da mutação Ala122Thr de PUITÁ INTA CL. Abaixo, foi testada a mutação Ser653Asp de Sator CL. Porto Alegre, RS. 2010.

A principal desvantagem da análise não paramétrica é o fato da não generalidade, ou seja, não há um único teste capaz de ser aplicado em qualquer delineamento, como o teste F em análises paramétricas. Ao contrário, para cada delineamento um ou mais testes são desenvolvidos. O delineamento utilizado neste experimento foi o de blocos completos casualizados em parcela subdividida. Segundo Zimmermann (2004, pág. 359), como não existe um teste não paramétrico específico para este delineamento então se deve realizar a análise da variância paramétrica sobre os dados e sobre os postos obtidos da ordenação dos dados para verificar se ambos derivam resultados semelhantes. Se os resultados forem semelhantes, as suposições que sustentam a análise de variância são razoáveis e validam a utilização da análise (Payton *et al.*, 2006; Mehrotra *et al.*, 2010). Caso os resultados sejam discrepantes, a análise com os dados transformados em postos é geralmente mais

precisa que aquela realizada com os dados originais (Zimmermann, 2004, pág. 359). Em análises não paramétricas, a ordenação das observações em postos é usual. Por exemplo, os testes de Kruskal-Wallis, de Wilcoxon, de Mann-Whitney e de Friedman utilizam os postos ao invés dos dados originais (Zimmermann, 2004; Mehrotra *et al.*, 2010).

Para a realização do procedimento discutido acima no presente estudo, os dados foram ordenados em ordem crescente e a análise foi realizada sobre os dados originais e sobre os postos dos dados ordenados (Tabela 12). Foi realizada análise de variâncias heterocedásticas de Welch (1951), que testa apenas efeitos principais (Tabela 13). Como os resultados destes procedimentos foram semelhantes, a discussão foi realizada tomando como base a Tabela 12, conforme descrito por Zimmermann (2004, pág. 359) e Mehrotra *et al.* (2010).

TABELA 12. Análise de variância do fluxo gênico de cultivares de arroz e arroz vermelho resistentes à imidazolinonas para cultivar e arroz vermelho suscetíveis. As plantas suscetíveis foram receptoras de pólen e as resistentes foram doadoras. Análise realizada com base nos dados originais e com postos das observações ordenadas. Porto Alegre, RS. 2010.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados		Quadrado médio		F		Significância	
		Dados	Postos	Dados	Postos	Dados	Postos	Dados	Postos
Bloco	3	0,0031	1,2402	0,0010	0,4134	1,0600	1,0600	0,3654	0,3654
Receptor de pólen	1	0,0518	20,720	0,0518	20,720	126,80	126,80	0,0015**	0,0015**
Erro A	3	0,0012	0,4902	0,0004	0,1634				
Doador de pólen	3	0,0045	1,7871	0,0015	0,5957	1,9700	1,9700	0,1546	0,1546
Receptor*Doador	3	0,0051	2,0371	0,0017	0,6790	2,2500	2,2500	0,1178	0,1178
Erro B	18	0,0136	5,4414	0,0008	0,3023				
Distância	3	0,0036	1,4434	0,0012	0,4811	1,2300	1,2300	0,2966	0,2966
Direção Cardeal	3	0,0001	0,0215	0,0000	0,0072	0,0200	0,0200	0,9966	0,9966
Erro C	474	0,4618	184,72	0,0010	0,3897				
Total	511	0,5448	217,9043						

** Efeito significativo ao nível de $P < 0,01$

TABELA 13. Análise de variância heterocedástica de Welch para efeitos principais de receptor de pólen, doador de pólen, distância da fonte doadora e direção cardinal. Porto Alegre, RS. 2010.

Fonte da Variação	Graus de Liberdade	F	Significância
Receptor de pólen	1	53,59	0,0001**
Erro	430,4		
Doador de pólen	3	1,68	0,1716
Erro	280,3		
Distância da fonte doadora	3	1,01	0,3871
Erro	281,9		
Direção cardinal	3	0,02	0,9973
Erro	282,0		

** Efeito significativo ao nível de $P < 0,01$

As análises de variâncias mostraram que houve efeito significativo do fator receptor de pólen. Desta forma, o biótipo de arroz vermelho suscetível e a cultivar IRGA 417 diferiram entre si em relação ao fluxo gênico observado (Tabela 12). O teste de comparação de médias de Tukey indicou que o arroz vermelho suscetível proporcionou maior fluxo gênico que a cultivar IRGA 417 (Tabela 14). Isto pode ocorrer devido a diferenças morfológicas nas estruturas reprodutivas da cultivar e do arroz vermelho, sobretudo em relação aos estames e pistilos.

TABELA 14. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes à imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função das plantas receptoras. Porto Alegre, RS. 2010.

Receptor de pólen	Sementes testadas	Plantas resistentes detectadas	Fluxo Gênico (%)
Arroz vermelho suscetível	512000	176	0,0344 A ¹
IRGA 417	512000	73	0,0142 B

¹Médias diferentes de acordo com o teste de Tukey à 5%.

A flor na espécie *Oryza sativa* é composta por seis estames e um pistilo (Yoshida *et al.*, 2007). Os estames são compostos de duas anteras seladas sustentadas por um filamento e o pistilo contém apenas um óvulo. Na fase de polinização as glumas se abrem e, simultaneamente, os estames alongam fazendo com que as anteras se

movam para fora (Matsui & Kagata, 2003). Os grãos de pólen caem sobre o estigma, e ao germinarem alcançam o ovário via tubo polínico, fecundando-o (Matsui & Kagata, 2003). Algumas características como prostrusão do estigma, comprimentos do pistilo, comprimento do estigma e dos pelos do estigma, tamanho da abertura das anteras e número de grãos depositados no estigma são altamente correlacionadas com fecundação cruzada em plantas de arroz (Kato & Namai, 1987; Matsui & Kagata, 2003). Estas características podem estar presentes em maior intensidade no arroz vermelho em comparação com a cultivar IRGA 417 favorecendo a fecundação cruzada ou fluxo gênico.

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). De fato, Noldin *et al.* (2002) mostraram que uma cultivar de arroz resistente ao herbicida glufosinato de amônio apresentou menor fluxo gênico como receptor de pólen em comparação com biótipos de arroz vermelho. Matsui e Kagata (2003) mostraram que cultivares indígenas de arroz apresentaram menor número de grãos de pólen sobre os estigmas que as cultivares melhoradas geneticamente devido à menor abertura do poro basal das anteras. Como a fecundação deve ocorrer no momento da abertura da espiguetas, poros menores mantêm mais grãos de pólen dentro das anteras, que ao saírem podem liberar os grãos remanescentes em outros locais que não o estigma da própria espiguetas. Isso indica que no processo de melhoramento, aquelas características que favorecem a fecundação cruzada são provavelmente diminuídas. No âmbito do arroz vermelho, estas informações são

importantes, pois explicam porque o biótipo de arroz vermelho apresentou maior frequência de fluxo gênico em relação a cultivar IRGA 417.

O fato de o arroz vermelho ser mais receptivo ao pólen de outras plantas indica que o fluxo gênico ocorra mais intensamente no sentido da cultivar para o arroz vermelho. Isso indica que a introgressão das mutações no gene ALS do arroz cultivado para arroz vermelho esteja ocorrendo. Dessa forma, populações de arroz vermelho resistentes podem transmitir as mutações para populações suscetíveis. (Shivrain *et al.*, 2009a). Além disso, no caso de indivíduos portadores de mutações diferentes, pode ocorrer introgressão de mais de uma mutação para uma mesma população ou indivíduo. De fato, Roso *et al.* (2010a) encontraram indivíduos de arroz vermelho resistente portando duas ou mesmo três mutações no gene da ALS. Estas mutações são as mesmas encontradas nas cultivares resistentes IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL que são Gly₆₅₄Glu, Ala₁₂₂Thr e Ser₆₅₃Asp respectivamente (Roso *et al.*, 2010a).

Não houve variação significativa no fator doador de pólen (Tabela 12). Com isso, as cultivares resistentes IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL, Sator CL e o biótipo de arroz vermelho resistente foram iguais em relação a variável fluxo gênico que ficou em torno de 0,02% (Tabela 15).

TABELA 15. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes à imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função das plantas doadoras. Porto Alegre, RS. 2010.

Doador de pólen	Sementes testadas	Plantas resistentes detectadas	Fluxo Gênico (%)
Arroz vermelho resistente	256000	57	0,0270 ^{NS}
Sator CL	256000	68	0,0266
IRGA 422 CL	256000	62	0,0242
PUITÁ INTA CL	256000	50	0,0195

^{NS} Diferenças não significativas.

Uma diferença desse trabalho em relação a outros sobre fluxo gênico em arroz é a presença de somente uma planta doadora de pólen no centro de uma parcela semeada com plantas receptoras. No presente experimento, as plantas doadoras produziram em torno de 15 afilhos produtivos, os quais forneceram o pólen durante a floração. A concepção da presença de uma única planta doadora no centro de uma área de plantas receptoras favorece a interpretação com relação à ocorrência de escapes individuais de plantas resistentes aos herbicidas em lavouras. Além disso, esta concepção se enquadra em situações onde indivíduos resistentes estão presentes como contaminantes de sementes e em situações de indivíduos resistentes por mutações espontâneas no gene da ALS.

Vários trabalhos sobre fluxo gênico utilizaram mais plantas doadoras do que as usadas no presente estudo. O trabalho desenvolvido por Noldin *et al.* (2002) teve área de plantas doadoras de 1 m², em outro trabalho realizado por Shivrain *et al.* (2007) a área foi de 78 m². Ainda, no trabalho de Sanchez Olguin *et al.* (2009), realizado na Costa Rica, as parcelas foram semeadas em diferentes proporções, sendo que a menor continha 70% de plantas doadoras. Nestes trabalhos, a densidade de semeadura das plantas doadoras foi de aproximadamente 100 kg/ha o que garantiu pelo menos 250 plantas por metro quadrado. Mesmo em experimentos realizados em casa de vegetação, normalmente mais plantas são utilizadas, como na pesquisa de Shivrain *et al.* (2009b) onde foram utilizadas cinco plantas doadoras por parcela. Embora tenham sido reportadas diferenças no fluxo gênico para diferentes plantas receptoras, a presença de muitos indivíduos pode salientar possíveis diferenças entre plantas doadoras de pólen, o que não ocorreu no presente experimento. Esta limitação pode ser superada aumentando a área destinada às plantas doadoras de pólen, aumentando assim, a pressão do mesmo sobre as plantas receptoras. Além disso, grãos de pólen da própria planta de arroz foram

mais bem aceitos pelos estigmas em comparação com grãos oriundos plantas de arroz silvestre mesmo sem competição de pólen (Song *et al.*, 2002). Além disso, na proporção de 1:1, ou seja, havendo competição entre os grãos de pólen de plantas distintas, houve apenas 2% de fluxo gênico (Song *et al.*, 2002). Isto indica que é necessária certa pressão de pólen para haver a fecundação cruzada e para que diferenças entre genótipos possam ser salientadas. Neste caso, muitas plantas devem ser utilizadas como doadores de pólen.

Embora na análise de variância a interação receptor/doador não tenha sido significativa (Tabela 12), realizou-se análise pelo método dos mínimos quadrados ajustados pelo teste Tukey a fim de comparar o fluxo gênico ocorrido em cada combinação de um receptor com cada doador (Tabela 16). 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 16). Este é mais uma evidência que o arroz vermelho suscetível foi mais receptivo que a cultivar IRGA 417 para com o pólen de outros indivíduos.

TABELA 16. 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.

Diversos trabalhos mostraram que certos genótipos são mais compatíveis com outros e assim o fluxo gênico entre eles é potencializado. Ainda, certos genótipos são mais eficientes como doadores de pólen e favorecem o fluxo gênico em relação à outros. Foi mostrado por Noldin et al. (2002) que um biótipo de arroz vermelho teve maior fluxo gênico que outro em combinação com a mesma linhagem resistente à glufosinato de amônio. Além disso, diversas populações de arroz vermelho apresentaram compatibilidade variável com uma cultivar de arroz resistente aos herbicidas imidazolinonas (Shivrain *et al.*, 2008; Shivrain *et al.*, 2009a), havendo combinações cujo fluxo gênico foi cinco vezes maior que outras. Em relação ao efeito de cultivares de arroz, a cultivar CL 121 apresentou menor fluxo gênico quando comparada com a cultivar CL 161 (Shivrain *et al.*, 2007), ambas as cultivares não são disponíveis no Brasil, mas são genitoras de cultivares brasileiras como IRGA 422 CL e Sator CL respectivamente.

Nas condições do presente experimento, o fator distância não teve efeito significativo ao nível de 5% (Tabela 12). As médias de fluxo gênico concernentes a este fator são mostradas na Tabela 17. Isto ocorreu devido ao diâmetro limitado da parcela utilizado neste experimento que permitiu avaliação de no máximo 3,5 m de distância da planta doadora.

TABELA 17. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes à imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função da distância da fonte doadora de pólen. Porto Alegre, RS. 2010.

Distância (m)	Sementes testadas	Plantas resistentes detectadas	Fluxo Gênico (%)
0,5	256000	74	0,0289 ^{NS}
1,5	256000	58	0,0230
2,5	256000	59	0,0227
3,5	256000	58	0,0227

^{NS} Diferenças não significativas a 5%.

A frequência de fluxo gênico diminui com o aumento da distância entre a planta doadora de pólen e a receptora (Yao *et al.*, 2008; Jhala *et al.*, 2010). Isto porque a densidade de pólen da planta doadora incidente sobre as espiguetas das plantas receptoras diminui exponencialmente com o aumento da distância (Kanya *et al.*, 2009; Rong *et al.*, 2010). Entretanto, diversos trabalhos têm mostrado que distâncias de 0,3 a 3,5 m apresentam uma frequência de fluxo gênico pouco variável. Por exemplo, Messeguer *et al.* (2004) estudando fluxo gênico entre arroz transgênico e arroz vermelho observou um fluxo médio de 0,01% até 2,5 m de distância. Neste trabalho a variação do fluxo gênico em função da distância apresentou diminuição exponencial avaliada até 10 m das plantas doadoras. No trabalho desenvolvido por Chen *et al.* (2004), o fluxo gênico entre arroz cultivado e arroz vermelho foi de 0,01% em média até 5 m de distância das plantas doadoras. Nos trabalhos de Shivrain *et al.* (2007; 2009a) nos quais foi estudado o fluxo gênico de cultivares de arroz resistente aos herbicidas imidazolinonas para biótipos de arroz vermelho, o fluxo médio observado foi de 0,01% até 2 m e 0,002 até 5 m de distância das plantas doadoras.

As variações no fluxo gênico que ocorrem em pequenas distâncias possivelmente não permitem ajuste exponencial, mas sim linear. Isso porque a diminuição exponencial é caracterizada por uma fase linear inicial de diminuição lenta, que acelera rapidamente até atingir um platô muito próximo de zero (Yao *et al.*, 2008). Por isso, em estudos de fluxo gênico em arroz cuja distância da fonte doadora de pólen não ultrapasse 5 a 10 m espera-se que a relação entre estes fatores seja linear. De fato, em estudo realizado na China o fluxo gênico entre arroz e arroz silvestre variou exponencialmente até uma distância de 30 m (Yao *et al.*, 2008). Entretanto, esta variação foi linear até 3 m. A variação da dispersão de pólen a partir das plantas doadoras foi linear até 10 m (Yao *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado no Quênia, os

grãos de pólen de cultivares de arroz dispersaram-se exponencialmente até 300 m a partir da fonte doadora, na direção dos ventos predominantes. Entretanto, em direções de ventos menos intensos, a variação foi linear até 250 m (Kanya *et al.*, 2009). Embora o fluxo gênico não tenha sido avaliado neste estudo, a dispersão dos grãos de pólen é altamente relacionada ao fluxo gênico (Yao *et al.*, 2008) e dessa forma inferências comparativas podem ser realizadas. No presente experimento, embora a análise de variância tenha indicado uma significância de 0,29 para a distância, a análise de regressão mostrou, com um $R^2=0,65$, que o fluxo diminuiu linearmente de 0,5 a 3,5 m (Figura 13). De forma geral, as taxas de fluxo gênico obtidas no ensaio em cada distância foram semelhantes àsquelas encontradas na literatura (Tabela 17).

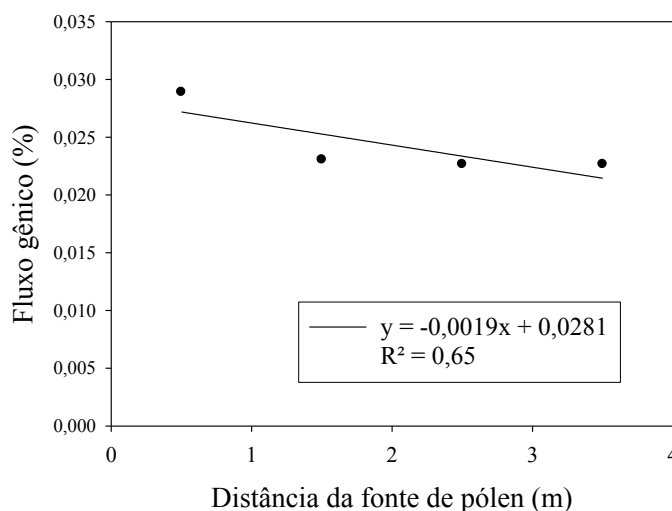


FIGURA 13. Fluxo gênico de entre plantas de arroz cultivado e arroz vermelho em função da distância da fonte doadora de pólen. Porto Alegre, RS. 2010.

Em relação à direção cardinal, o fluxo gênico não variou significativamente conforme análise de variância (Tabela 12). Nas quatro direções avaliadas no experimento o fluxo gênico observado foi de 0,02% aproximadamente (Tabela 18). As direções predominantes do vento na Estação Experimental do Arroz do IRGA em Cachoeirinha, durante o período de floração das plantas, foram Sul e Leste (Figura 14),

entretanto, a intensidade média e duração dos ventos não foram suficientes para afetar a direção fluxo gênico.

TABELA 18. Fluxo gênico de doadores de pólen resistentes à imidazolinonas para receptores de pólen suscetíveis em função das direções cardeais Porto Alegre, RS. 2010.

Direção Cardeal	Sementes testadas	Plantas resistentes detectadas	Fluxo Gênico (%)
Norte	256000	61	0,0238 ^{NS}
Sul	256000	63	0,0246
Leste	256000	63	0,0246
Oeste	256000	62	0,0242

^{NS} Diferenças não significativas.

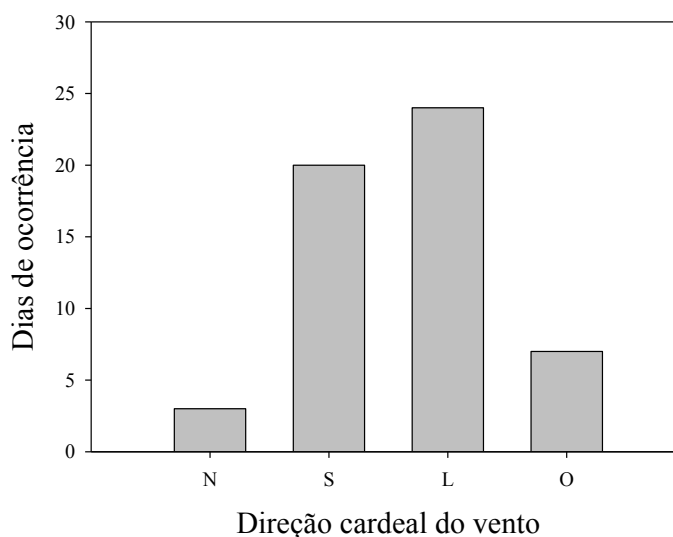


FIGURA 14. Ventos predominantes na Estação Experimental do Arroz, em Cachoeirinha/RS, durante a o período de antese das plantas de arroz, expressos em número de dias de ocorrência. Cachoeirinha, RS. 2010.

Teoricamente, os ventos predominantes nas horas em que as espiguetas das plantas de arroz abrem podem proporcionar maior transporte de pólen na direção desses ventos, aumentando a possibilidade de fluxo gênico nessa direção. Este tema foi estudado por Messeguer *et al.* (2001) e Messeguer *et al.* (2004) em relação ao fluxo gênico entre plantas de arroz. Nestes trabalhos, realizados em Amposta na Espanha, os autores mostraram que o fluxo gênico foi maior na direção Norte em relação às outras direções avaliadas, as quais foram igualmente ranqueadas. Segundo os autores, o vento

na direção Norte, que durava das 10h00 às 11h00, não era tão intenso quanto ventos de outras direções, mas o horário de ocorrência coincidia com a abertura das espiguetas o que favorecia o fluxo gênico nesta direção. Em outro trabalho, realizado por Song *et al.* (2003) em Huan na China, a direção Sul foi a qual o fluxo gênico entre *Oryza sativa* e *Oryza rufipogon* foi maior, embora também tenha ocorrido fluxo gênico em todas as direções. Neste trabalho, até a distância de 1,2 m o fluxo foi igual em todas as direções. Por outro lado, Jhala *et al.* (2010) estudando fluxo gênico de *Linum usitatissimum* em Alberta no Canadá não observou efeito da direção cardinal. Nestes trabalhos, a distância do fluxo gênico em relação às plantas doadoras de pólen foram superiores a 3,5 m. Provavelmente, o efeito do vento transportando pólen é mais evidente quanto maior for a distância em avaliação. De fato, foi observado que grãos de pólen de cultivares de arroz dispersaram até 250 m na direção Norte em um estudo realizado no Quênia (Kanya *et al.*, 2009). Os autores indicaram que os ventos no local de realização deste estudo são predominantemente nessa direção. Comparativamente, na direção Leste a dispersão de pólen não ultrapassou 30 m (Kanya *et al.*, 2009).

Fica claro que a relação de fluxo gênico com a direção cardinal é dependente do regime de ventos de cada local e pode ainda, ser influenciado pelo microclima, uma vez que existe a ocorrência de fluxo mesmo nas direções opostas aos ventos predominantes. Por exemplo, o local de realização deste ensaio é cercado por árvores e construções urbanas que alteram a direção dos ventos e provavelmente mudam o sentido localmente (Figura 15). Como resultado, o pólen e, por conseguinte o fluxo gênico pode apresentar distribuição randômica em relação à direção cardinal (Rognli *et al.*, 2000; Urzay *et al.*, 2009), como o ocorrido no presente experimento. Dessa forma, estudos sobre fluxo gênico devem ter esse fator incluído nas avaliações, a fim de gerar conhecimentos mais

detalhados regional e localmente. Estas informações podem ser importantes, sobretudo em estudos de biossegurança envolvendo espécies silvestres e cultivadas.

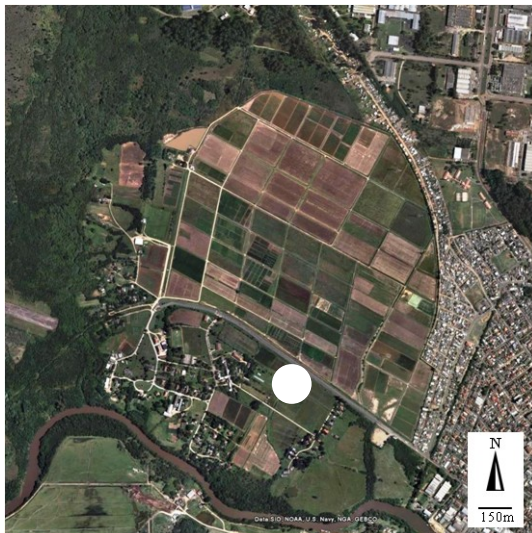


FIGURA 15. Estação Experimental do Arroz - IRGA em Cachoeirinha/RS, circundada por árvores ao Norte, Oeste e Sul. A cidade situa-se à Leste. O círculo branco indica o local da área experimental. Imagem de satélite NOAA/US obtida no *software* Google Earth, 2010.

O fluxo gênico de plantas cultivadas para espécies correlatas tem sido estudado ao longo das últimas décadas, principalmente em relação a culturas transgênicas ou resistentes aos herbicidas (Ellstrand *et al.*, 1999; Gealy *et al.*, 2003; Kavanagh *et al.*, 2010). A temática da biodiversidade de espécies em seus centros de origem também tem sido alvo destes estudos (Ellstrand *et al.*, 1999; Lu & Snow, 2005). Entre os principais fatores de risco estão a alteração na adaptação de plantas híbridas por incorporação de alelos vantajosos e o aumento do vigor híbrido devido aos cruzamentos espontâneos (Ellstrand, 2009). Estes fatores permitem que gerações subsequentes tornem-se mais competitivas em relação aos genitores, alterando a dinâmica das populações e reduzindo a diversidade genética. Em termos agrônômicos, estes fatores podem aumentar as perdas por competição com populações híbridas de plantas daninhas. De fato, alguns trabalhos têm comprovado estes efeitos em

relação à espécies de plantas cultivadas e correlatas dos gêneros *Oryza* (Niruntrayakul *et al.*, 2009; Shivrain *et al.*, 2009a), *Raphanus* (Snow *et al.*, 2010), *Sorgum* (Sahoo *et al.*, 2010), *Brassica* (Liu *et al.*, 2010), *Zea* (Ellstrand *et al.*, 2007) e *Manihot* (Duputie *et al.*, 2007) entre outros.

Em relação ao fluxo gênico de culturas resistentes aos herbicidas para espécies correlatas a principal desvantagem é a rápida perda de controle seletivo com herbicidas (Gealy *et al.*, 2003). Diversos biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas têm apresentado alterações positivas na adaptação (Park *et al.*, 2004; Trezzi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010), de forma que mesmo com a interrupção do uso destes produtos os alelos que conferem a resistência irão persistir nas populações ou mesmo aumentar sua frequência ao longo das gerações (Vila-Aiub *et al.*, 2009b). Em culturas onde cultivares resistentes aos herbicidas inibidores de ALS como o arroz, o milho e o trigo, por exemplo, o fluxo gênico pode incorporar a resistência nas espécies de plantas daninhas correlatas e provocar alteração na adaptação destas. Além disso, uma vez adquirindo a resistência a herbicidas, as populações de plantas daninhas podem introgridir os alelos de resistência a outras populações suscetíveis via transporte de sementes entre locais ou via pólen. Esta hipótese foi confirmada na cultura do arroz por Shivrain *et al.* (2009a) nos EUA. Agora, esta informação está sendo confirmada no Brasil pelo presente experimento realizado no Rio Grande do Sul, onde além de quantificar o fluxo gênico de diversas cultivares de arroz resistentes para arroz e arroz vermelho suscetível, confirmou que populações já resistentes de arroz vermelho transmitem a resistência a populações suscetíveis em proporção igual ou superior às fontes originais de resistência.

A frequência de fluxo gênico observada neste experimento é similar às observadas em outros estudos conforme mencionado anteriormente. Taxas de fluxo gênico de 0,02% aparentemente são pequenas (Rong *et al.*, 2005) de forma que sua

consequência nem sempre é devidamente dimensionada. 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. Assim, diversos estudos têm sido realizados visando minimizar a ocorrência de fluxo gênico entre arroz e arroz vermelho.

Algumas práticas poderiam minimizar o fluxo gênico entre arroz e arroz vermelho. Por exemplo, a época de semeadura em um dado local poderia ser alterada visando dessincronizar a floração do arroz cultivado com a população de arroz vermelho presente. No RS, a época de semeadura inicia em outubro e termina em novembro. Assim, é possível semear antecipadamente ou tardiamente em relação ao florescimento do arroz vermelho que é de aproximadamente 30 dias (Schwanke *et al.*, 2008). A utilização de cultivares de ciclo precoce permite que a colheita seja realizada antes da floração do arroz vermelho em alguns casos (Agostinetto *et al.*, 2001). Alguns estudos têm sido realizados e fim de determinar a variação do fluxo gênico em função da sincronia do florescimento de cultivares de arroz resistentes aos herbicidas e arroz vermelho (Noldin *et al.*, 2002; Niruntrayakul *et al.*, 2009; Sanchez Olguin *et al.*, 2009; Shivrain *et al.*, 2009b). A rotação da cultura do arroz com outras culturas (Agostinetto *et al.*, 2001) permite a utilização de herbicidas de diferentes modos de ação e assim, reduzir a população de arroz vermelho mesmo que esta seja resistente a herbicidas inibidores de ALS. Por exemplo, a rotação da cultura do arroz com soja é uma opção aplicável, pois esta é mais hábil que o arroz vermelho em captar nutrientes e luz em condições de campo (Moraes *et al.*, 2009), e proporciona a utilização de herbicidas de outros mecanismos de ação para o controle desta planta daninha. Em um estudo realizado no RS a rotação de

arroz com soja e milho reduziu o número de sementes viáveis de arroz vermelho do solo em 87% em média. Além disso, estudos mostraram que a rotação de arroz com soja ou milho apresenta bons índices de sustentabilidade, mensurados em função do consumo de energia do sistema (Verneti Junior *et al.*, 2009), além de aumentar a produção da cultura da soja (Brandt *et al.*, 2006). Entretanto, o cultivo de arroz no ocorre principalmente em solos hidromórficos, o que limita a realização da rotação de culturas a poucas áreas com sistema de drenagem eficiente (Griffin & Harger, 1990; Mussnug *et al.*, 2006).

Uma alternativa poderia ser a concentração da rotação da cultura do arroz com a soja em anos que apresentem condições meteorológicas de *La Niña*. Estas condições representam um dos extremos da variação do evento climático *El Niño* Oscilação Sul (ENOS) (Berlato & Fontana, 2003). Em condições de *La Niña*, a precipitação pluvial média no Rio Grande do Sul diminui de 55 a 95% e ocorre baixa nebulosidade entre outubro e dezembro (Berlato & Fontana, 2003). Estas condições beneficiam a cultura do arroz, pois a irrigação da cultura é baseada, sobretudo em alagamento. Por outro lado, a limitação de drenagem das áreas hidromórficas para semeadura da soja poderia ser superada pela menor precipitação em anos de *La Niña*. Assim, a manutenção da umidade destes solos em níveis satisfatórios para a soja favoreceria sua inclusão na rotação com arroz, possibilitando o controle do arroz vermelho com outros herbicidas que não imidazolinonas. Atualmente existem modelos de previsão dos efeitos do ENOS de forma que é possível obter previsões com 12 meses de antecedência (Adhikari *et al.*, 2010; Zheng & Zhu, 2010). Estas informações poderiam ajudar os produtores a definir estratégias de rotação de culturas com o arroz em anos mais secos, potencializando os benefícios da rotação no controle do arroz vermelho. Entretanto, estudos são necessários para confirmar esta hipótese e torná-la uma recomendação. São

necessários trabalhos futuros que avaliem os efeitos da rotação de culturas sobre o controle de arroz vermelho, sobretudo, naquelas populações resistentes aos herbicidas imidazolinonas.

Além das práticas de manejo do arroz vermelho discutidas acima, outra forma que pode ser utilizada para mitigar o fluxo gênico é o controle de escapes. Em áreas de produção de sementes, a técnica conhecida como *rouging* é utilizada para eliminar plantas daninhas que escapam ao controle químico (Agostinetto *et al.*, 2001; Shivrain *et al.*, 2009b). O *rouging* consiste em percorrer a área de cultivo para identificar e eliminar plantas indesejadas. Este método é oneroso em comparação com outros, porém mais eficaz. Ainda, o controle de escapes com herbicidas tem sido estudado. Foi observada redução maior que 50% na exerceção de panículas de arroz vermelho como resultado da aplicação do herbicida imazamox no estágio de emborrachamento (Menezes & Mariot, 2009a). Embora este seja um resultado interessante, mais trabalhos são necessários para sedimentar esta informação e torná-la uma recomendação técnica. Isso porque certas cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas apresentam redução da produção e peso de grãos, além de aumento de esterilidade nas espiguetas (Cassol *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos permitem concluir que o fluxo gênico de cultivares de arroz e arroz vermelho resistentes à imidazolinonas para arroz vermelho em condições de cultivo no Sul do Brasil ocorre em taxas iguais às aquelas observadas em áreas de cultivo de arroz de outros países. Entretanto, não foram detectadas diferenças entre estas cultivares resistentes e o arroz vermelho resistente, o que sugere que a doação de pólen nestes materiais é semelhante. 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. Nas condições do experimento, a distância e a direção cardeal do vento não afetaram o fluxo gênico entre os materiais testados.

4.2.2 Fluxo gênico entre populações de arroz vermelho

A utilização de 24 marcadores SSR nas 27 populações estudadas com número de indivíduos por população variando de 17 a 20, resultou na detecção de 269 alelos (Tabela 19). Todas as populações estudadas não seguiram o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com base nos testes de qui-quadrado, *likelihood ratio test* e teste exato de Fischer (Apêndice 4). Isso é esperado em populações de espécies autógamas em que a frequência de genótipos homozigotos é alta (Templeton, 2006b). Além disso, o alto valor do coeficiente de endogamia (f) confirma a predominância de autofecundação nestas populações (Tabela 19), corroborando com os testes de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Templeton, 2006b). O número médio de alelos por *locus* foi 11,21 com uma amplitude de 3 a 28, observados nos marcadores RM309 e RM252 respectivamente (Tabela 19). Este valor é consistente com diversos estudos de diversidade genética em arroz através de marcadores SSR (Garris *et al.*, 2005; Londo & Schaal, 2007; Gealy *et al.*, 2009). A alta taxa de mutações nas regiões SSR favorece o aparecimento de muitos alelos por *locus*, resultando em marcadores altamente polimórficos (Varshney *et al.*, 2005). De fato, todos os *loci* foram polimórficos em relação ao total de indivíduos estudados, conforme é indicado pelo número de alelos por *locus* polimórfico (Tabela 19). A heterozigosidade esperada média foi de 0,65 e a heterozigosidade observada média foi de 0,12 (Tabela 19). Estes mesmos marcadores foram utilizados na caracterização da diversidade genética da Coleção Nuclear de Arroz da Embrapa onde resultados semelhantes foram observados em termos de número médio de alelos e conteúdo de informação polimórfico (PIC)

(Borba *et al.*, 2009a). O PIC foi relativamente alto nos marcadores SSR utilizados. Na média dos 24 SSR o PIC foi de 0,61, variando de 0,35 a 0,81 (Tabela 19).

TABELA 19. Medidas de diversidade em populações de arroz usando 24 marcadores SSR, baseadas em maior frequência alélica (MFA), número de alelos por *locus* (A), número de alelos por *locus* polimórfico (AP), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (f). Porto Alegre, RS, 2010.

SSR	MFA	A	AP	He	Ho	PIC	f
4653	0,47	9	9	0,68	0,15	0,63	0,78
OG106	0,31	13	13	0,78	0,08	0,75	0,90
RM103	0,54	5	5	0,50	0,07	0,38	0,86
RM204	0,76	9	9	0,39	0,07	0,35	0,83
RM257	0,43	16	16	0,72	0,13	0,68	0,82
RM38	0,46	8	8	0,59	0,08	0,51	0,86
OG44	0,91	7	7	0,17	0,13	0,16	0,21
RM171	0,62	7	7	0,52	0,09	0,45	0,82
RM229	0,51	7	7	0,66	0,17	0,62	0,75
RM231	0,43	6	6	0,67	0,15	0,60	0,78
RM287	0,45	9	9	0,73	0,11	0,70	0,84
RM7	0,49	6	6	0,64	0,24	0,57	0,62
OG10	0,36	13	13	0,77	0,11	0,74	0,86
RM14	0,32	19	19	0,81	0,13	0,78	0,84
RM210	0,44	12	12	0,70	0,08	0,66	0,88
RM222	0,37	9	9	0,72	0,09	0,67	0,87
RM253	0,37	11	11	0,73	0,09	0,69	0,88
RM309	0,45	3	3	0,62	0,08	0,54	0,88
RM11	0,62	16	16	0,58	0,14	0,55	0,76
RM207	0,38	16	16	0,72	0,08	0,68	0,89
RM248	0,34	17	17	0,78	0,25	0,75	0,68
RM252	0,39	28	28	0,82	0,11	0,81	0,87
RM263	0,40	11	11	0,70	0,10	0,65	0,86
RM55	0,40	12	12	0,67	0,10	0,61	0,85
Média	0,47	11,21	11,21	0,65	0,12	0,61	0,82

As populações de arroz avaliadas apresentaram número médio de alelos de 3,25 (Tabela 20). No entanto, as populações de arroz vermelho apresentaram maiores números médios de alelos em comparação com as cultivares (Tabela 20). A proporção de *loci* polimórficos (P) foi alta na maioria das populações. Entre as populações de arroz vermelho o P variou de 0,92 a 1, por outro lado, nas cultivares a variação desta medida foi de zero a 0,6 (Tabela 20). A diversidade gênica foi 0,47 e a heterozigosidade foi 0,13 na média de todas as populações e *loci* SSR (Tabela 20). Ainda, o f observado foi

alto, com média de 0,77 confirmando a predominância de autofecundação das populações de arroz vermelho. Entretanto, a população Agudo 3 apresentou baixo valor deste parâmetro (Tabela 20), indicando alta taxa de fecundação cruzada com indivíduos de populações distintas ou mesmo com cultivares de arroz. Isto é corroborado pelo alto valor da heterozigosidade observada ($H_o=0,3$) em comparação com as demais populações.

TABELA 20. Medidas de diversidade em populações de arroz vermelho e cultivares de arroz baseada em número de alelos médio de alelos, proporção de *loci* polimórficos (P), heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (f). Porto Alegre, RS. 2010.

População	n	Nº médio de alelos	P	He	Ho	PIC	f
Agudo 1	20	4,46	1,00	0,67	0,17	0,55	0,77
Agudo 2	20	4,33	0,96	0,60	0,14	0,53	0,78
Agudo 3	20	3,54	0,92	0,55	0,30	0,46	0,48
Agudo 4	20	3,54	0,79	0,46	0,13	0,39	0,74
Alegrete	20	3,25	0,88	0,45	0,10	0,39	0,79
Arroio Grande 1	20	3,46	0,96	0,56	0,10	0,48	0,82
Arroio Grande 2	20	2,75	0,92	0,38	0,13	0,32	0,67
Arroio Grande 3	20	2,92	0,92	0,45	0,09	0,39	0,82
Cacequi 1	20	3,79	0,96	0,58	0,12	0,50	0,79
Cacequi 2	20	3,63	0,96	0,57	0,05	0,49	0,92
Cacequi 3	20	3,83	0,96	0,53	0,08	0,45	0,85
Cacequi 4	20	3,54	1,00	0,43	0,10	0,37	0,78
Cacequi 5	18	3,38	0,96	0,56	0,24	0,47	0,60
Cacequi 6	20	3,79	0,96	0,57	0,06	0,49	0,90
Campo Bom	20	3,67	1,00	0,45	0,10	0,38	0,78
Caverá	20	4,46	1,00	0,63	0,17	0,55	0,73
São Gabriel 1	20	3,50	1,00	0,48	0,08	0,42	0,83
São Gabriel 2	20	2,71	0,96	0,32	0,07	0,27	0,79
São Gabriel 3	17	2,46	1,00	0,53	0,07	0,58	0,86
São Gabriel 4	20	2,29	0,94	0,54	0,09	0,59	0,84
Harmonia	20	3,54	0,96	0,43	0,09	0,38	0,79
Manoel Viana 1	20	3,79	1,00	0,54	0,22	0,47	0,59
Manoel Viana 2	20	4,08	1,00	0,60	0,14	0,52	0,78
Santa Margarida do Sul 1	20	3,08	0,92	0,47	0,14	0,39	0,71
Santa Margarida do Sul 2	19	2,00	0,94	0,46	0,11	0,53	0,76
Santo Antônio da Patrulha 1	20	4,25	1,00	0,55	0,08	0,49	0,85
Santo Antônio da Patrulha 2	20	3,83	1,00	0,58	0,11	0,50	0,82
Média das populações	-	3,48	0,96	0,52	0,12	0,46	0,77
IRGA 417	1	0,88	0,05	0,05	0,05	0,18	0,00
IRGA 422 CL	1	0,88	0,05	0,05	0,05	0,18	0,00
PUITÁ INTA CL	1	0,83	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00
Sator CL	1	1,00	0,60	0,60	0,60	0,52	0,00

Os presentes resultados demonstraram que as populações de arroz vermelho do RS apresentam diversidade genética relativamente alta, embora exista considerável variação entre estas populações. Este resultado foi diferente daqueles encontrados em populações de arroz vermelho do Arkansas, nos EUA (Shivrain *et al.*, 2010a) e Japão (Kawasaki *et al.*, 2009) onde menor diversidade genética foi observada. Por outro lado, a diversidade genética de outras populações de arroz vermelho coletadas nos EUA (Gealy *et al.*, 2009) e na Coreia do Sul (Chung & Park, 2010) foram semelhantes às encontradas no presente estudo. Alguns autores apontam que fatores como tamanho da amostra e diferenças entre locais e áreas de coleta podem influenciar consideravelmente os resultados de diversidade genética (Cao *et al.*, 2006; Ward & Jasieniuk, 2009).

De forma geral, em populações naturais de espécies autógamas é esperada baixa diversidade genética devido ao alto grau de homozigose (Templeton, 2006b). Entretanto, em se tratando de populações advindas de áreas de cultivo agrícola, como o arroz vermelho, a diversidade dentro das populações pode ser mais elevada (Xia *et al.*, 2011). Isso é possível devido à seleção imposta por práticas de manejo como o *rouging* por exemplo. O controle de escapes de arroz vermelho através desse método elimina das populações indivíduos fenotipicamente diferentes do arroz cultivado. 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 as populações de arroz vermelho através do fluxo gênico pode aumentar a diversidade destas populações (Londo & Schaal, 2007). A utilização de cultivares de diferentes origens genéticas agravaria este cenário. O fluxo gênico entre lavouras por razões diversas aumenta igualmente a diversidade genética das populações (Londo & Schaal, 2007). Como estes fatores são dependentes das práticas de cultivo de arroz e manejo do arroz vermelho em

cada local, resultados divergentes são esperados para populações de locais distintos. Por exemplo, populações de arroz vermelho também do RS, avaliadas a partir de marcadores SSR e isoenzimáticos, apresentaram diversidade genética parecida com a encontrada no presente estudo (Malone *et al.*, 2007). A alta diversidade genética destas populações provê ampla capacidade de adaptação a diferentes ecossistemas, aumentando a competitividade do arroz vermelho (Ellstrand *et al.*, 2010). Este processo, embora não desejado no ponto de vista de controle de plantas daninhas, representa uma oportunidade para o melhoramento do arroz (Cao *et al.*, 2006; Malone *et al.*, 2007).

Para identificar a proporção da variação genética entre as populações e dentro das populações de arroz vermelho foi realizada a análise da variância molecular (AMOVA). Nesta análise, a variação genética dos 534 acessos de arroz vermelho avaliados, baseada em 24 marcadores SSR foi de 26% entre populações e de 74% dentro das populações (Tabela 21). 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 21. Análise de variância molecular (AMOVA) das 27 populações de arroz vermelho baseada na análise de 24 marcadores SSR e fluxo gênico (Nm). Porto Alegre, RS. 2010.

Fonte da Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Componentes da Variância	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	0,7				

$$^1Nm = [(1 / F_{ST}) - 1] / 4$$

A diferenciação genética, ilustrada pelo F_{ST} entre as populações de arroz vermelho no presente estudo é considerada alta. Isto é devido provavelmente ao sistema de fecundação predominante no arroz vermelho que é a autogamia. Entretanto, o F_{ST}

observado nas populações do presente estudo é menor que o encontrado para outras populações de arroz vermelho de outros locais do mundo, que foi de 0,56 (Londo & Schaal, 2007), 0,44 (Gealy *et al.*, 2009) e 0,47 (Chung & Park, 2010).

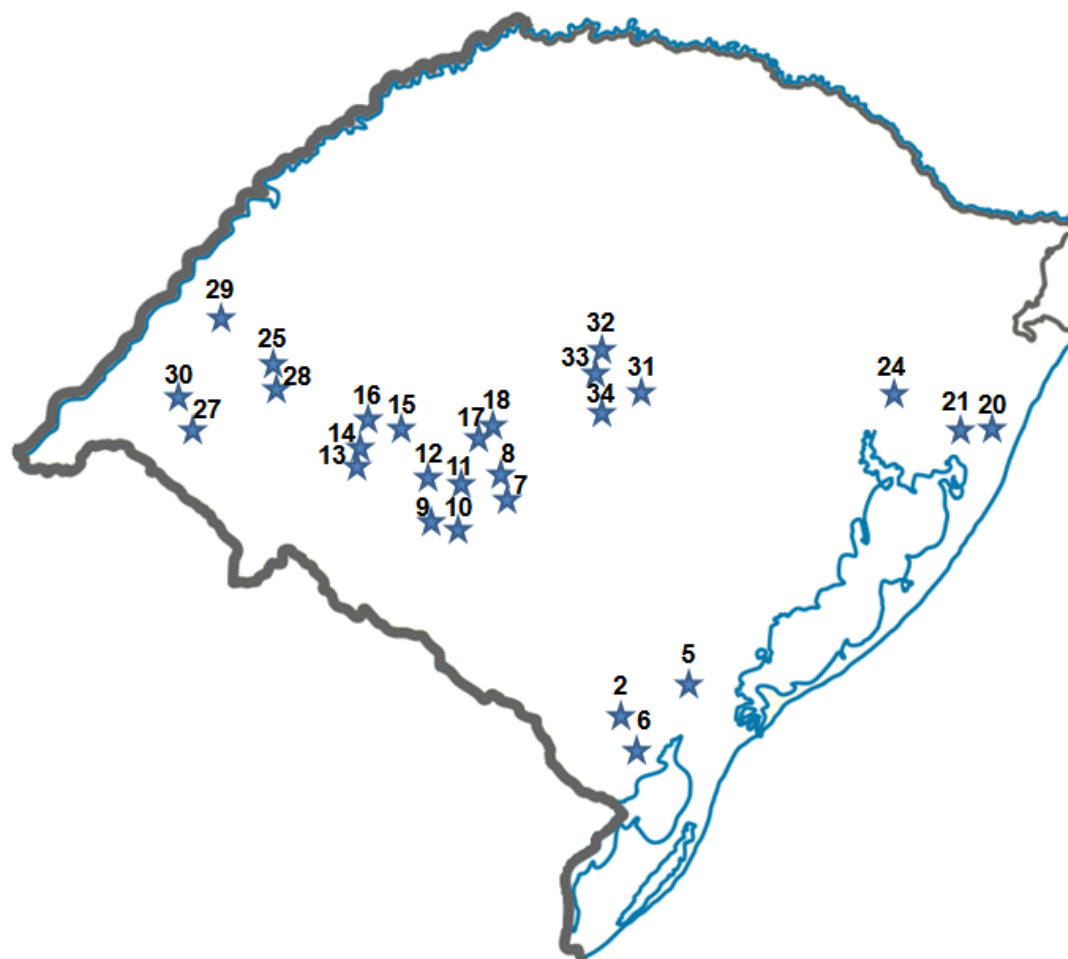
As populações de arroz vermelho do RS avaliadas no presente estudo apresentaram média variabilidade genética. Entretanto, foi encontrada alta variação dentro das populações o que reforça hipótese de ocorrência de fluxo gênico entre as populações e das cultivares para populações de arroz vermelho. Em populações de arroz vermelho do Arkansas, EUA, foi observado maior diversidade entre as populações estudadas. No entanto, um quarto destas populações apresentou compartilhamento de alelos com as cultivares utilizadas naquele local (Shivrain *et al.*, 2010a). Em outro trabalho realizado com populações de arroz vermelho da Coreia do Sul, a diferenciação genética entre estas e cultivares foi similar à observada neste estudo (Chung & Park, 2010). Os autores atribuíram a origem de certas populações de arroz vermelho da Coreia do Sul a uma cultivar cujo uso foi interrompido (Suh *et al.*, 1997; Chung & Park, 2010).

No caso das populações de arroz vermelho do Sul do Brasil avaliadas no presente estudo duas situações são possíveis. Primeiro, pode estar havendo fluxo gênico entre populações de arroz vermelho através da migração de sementes. A grande utilização de sementes não certificadas pelos orizicultores do RS (Marchezan *et al.*, 2001) frequentemente contaminadas por arroz vermelho, pode ser a principal razão deste fato. Segundo, as cultivares mais utilizadas na época da amostragem, IRGA 417 e IRGA 422 CL, estariam fornecendo seus alelos para populações geograficamente distantes entre si, fazendo o F_{ST} diminuir em relação aos valores observados em outros trabalhos. A estimativa de fluxo gênico (Nm) pelo modelo de ilhas infinitas de Wright (1951) suporta esta teoria. Baseado no F_{ST} , o Nm

encontrado foi de 0,7 (Tabela 21). Este valor está acima dos valores encontrados em populações de arroz vermelho de outros locais do mundo, que a partir desse método foram estimados em 0,47 (Cao *et al.*, 2006), 0,32 (Gealy *et al.*, 2009) e 0,55 (Chung & Park, 2010). O Nm encontrado no presente estudo indica que em média 0,7 indivíduos são migrantes por geração nas populações de arroz vermelho estudadas. Teoricamente, um indivíduo migrante por geração, ou seja, Nm=1 reduz o F_{ST} de uma população em 80% (Templeton, 2006a). Isso significa que somente um indivíduo migrante por geração pode estreitar drasticamente a relação genética entre populações.

A fim de entender as relações genéticas das populações de arroz vermelho e o arroz cultivado de diferentes locais do RS foi estimada a distância genética não viciada de Nei (1983) entre as populações (Tabela 22). As populações de arroz vermelho tiveram estreitas distâncias genéticas com as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL, e PUITÁ INTA CL comparadas com a cultivar Sator CL. Para ilustrar as relações genéticas entre estas populações, foi construído um dendograma baseado no método *Unweighted Pair Group Method* (UPGMA) a partir da matriz de distâncias genéticas (Tabela 22 e Figura 16). O dendograma UPGMA mostrou que as todas as populações de arroz vermelho foram agrupadas em um grande grupo, e este alocado proximamente a outro grupo contendo as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL (Figura 17). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado com 30 populações de arroz vermelho amostradas no nordeste da China (Cao *et al.*, 2006). Todas as populações estudadas neste trabalho foram agrupadas com cultivares da província de Liaoning, bastante utilizada pelos agricultores locais. Essas populações apresentaram semelhante diferenciação genética e alta similaridade com certas cultivares de arroz utilizadas na região de coleta, a exemplo do que foi observado no presente estudo. Os autores atribuíram isto a hibridizações entre as cultivares e os

biótipos de arroz vermelho e a mutações ocorridas em indivíduos de arroz cultivados. Em outro trabalho, também realizado na China, foram avaliadas 11 populações oriundas de três províncias chinesas (Xia *et al.*, 2011). Estas populações foram agrupadas com as cultivares respectivamente utilizadas em cada província (Xia *et al.*, 2011).



2	Arroio Grande 1	13	Cacequi 1	25	Manoel Viana 1
5	Arroio Grande 2	14	Cacequi 2	27	Harmonia
6	Arroio Grande 3	15	Cacequi 3	28	Manoel Viana 2
7	Santa Margarida do Sul 1	16	Cacequi 4	29	Alegrete
8	Santa Margarida do Sul 2	17	Cacequi 5	30	Caverá
9	São Gabriel 1	18	Cacequi 6	31	Agudo 1
10	São Gabriel 2	20	Santo Antônio da Patrulha 1	32	Agudo 2
11	São Gabriel 3	21	Santo Antônio da Patrulha 2	33	Agudo 3
12	São Gabriel 4	24	Campo Bom	34	Agudo 4

FIGURA 16. Mapa do Rio Grande do Sul mostrando a distribuição das 27 populações de arroz vermelho coletadas na metade sul do Estado. A numeração corresponde ao nome dado às populações.

TABELA 22. Distância genética (Nei, 1983) entre 27 populações de arroz vermelho e 4 cultivares de arroz baseada em 24 SSR. Porto Alegre, RS. 2010

População	Arroio Grande 1	Arroio Grande 2	Arroio Grande 3	Sta Margarida do Sul 1	Sta Margarida do Sul 2	São Gabriel 1	São Gabriel 2	São Gabriel 3	São Gabriel 4	Cacequi 1	Cacequi 2	Cacequi 3	Cacequi 4	Cacequi 5	Cacequi 6	Sto Antônio Patrulha 1	Sto Antônio Patrulha 2
Arroio Grande 1	-																
Arroio Grande 2	0,29	-															
Arroio Grande 3	0,25	0,32	-														
Sta Margarida do Sul 1	0,16	0,31	0,29	-													
Sta Margarida do Sul 2	0,18	0,40	0,32	0,15	-												
São Gabriel 1	0,26	0,33	0,38	0,19	0,26	-											
São Gabriel 2	0,41	0,35	0,44	0,34	0,38	0,25	-										
São Gabriel 3	0,21	0,33	0,37	0,17	0,19	0,25	0,35	-									
São Gabriel 4	0,18	0,31	0,35	0,17	0,15	0,28	0,36	0,10	-								
Cacequi 1	0,18	0,18	0,28	0,21	0,22	0,28	0,31	0,22	0,20	-							
Cacequi 2	0,20	0,28	0,28	0,22	0,28	0,28	0,33	0,27	0,24	0,14	-						
Cacequi 3	0,17	0,27	0,28	0,13	0,18	0,23	0,28	0,15	0,13	0,17	0,17	-					
Cacequi 4	0,32	0,17	0,39	0,35	0,44	0,36	0,29	0,35	0,35	0,16	0,24	0,26	-				
Cacequi 5	0,22	0,18	0,27	0,18	0,22	0,27	0,31	0,17	0,18	0,09	0,17	0,13	0,18	-			
Cacequi 6	0,12	0,32	0,26	0,18	0,15	0,26	0,41	0,21	0,20	0,21	0,22	0,17	0,35	0,22	-		
Sto Antônio Patrulha 1	0,21	0,43	0,38	0,34	0,29	0,37	0,49	0,29	0,30	0,31	0,36	0,32	0,41	0,37	0,20	-	
Sto Antônio Patrulha 2	0,13	0,28	0,30	0,15	0,14	0,23	0,38	0,16	0,18	0,14	0,21	0,16	0,29	0,15	0,11	0,19	-
Campo Bom	0,29	0,41	0,48	0,43	0,39	0,43	0,45	0,36	0,38	0,33	0,40	0,34	0,30	0,36	0,28	0,17	0,23
Manoel Viana 1	0,16	0,27	0,30	0,20	0,17	0,27	0,40	0,19	0,17	0,19	0,20	0,20	0,33	0,20	0,19	0,28	0,14
Harmonia	0,42	0,42	0,43	0,45	0,48	0,46	0,45	0,47	0,46	0,26	0,23	0,38	0,34	0,36	0,41	0,43	0,39
Manoel Viana 2	0,14	0,31	0,29	0,19	0,13	0,24	0,39	0,18	0,16	0,21	0,23	0,19	0,34	0,22	0,13	0,25	0,15
Alegrete	0,23	0,25	0,28	0,22	0,27	0,31	0,35	0,30	0,23	0,17	0,19	0,19	0,31	0,19	0,26	0,44	0,23
Caverá	0,15	0,27	0,28	0,17	0,16	0,21	0,37	0,16	0,16	0,16	0,22	0,16	0,28	0,16	0,13	0,22	0,10
Agudo 1	0,27	0,44	0,45	0,27	0,29	0,32	0,51	0,28	0,32	0,36	0,34	0,28	0,48	0,34	0,23	0,31	0,23
Agudo 2	0,21	0,37	0,38	0,22	0,29	0,32	0,40	0,24	0,26	0,27	0,25	0,20	0,35	0,27	0,23	0,25	0,20
Agudo 3	0,16	0,39	0,33	0,17	0,18	0,28	0,45	0,22	0,21	0,26	0,26	0,20	0,42	0,26	0,17	0,25	0,16
Agudo 4	0,20	0,46	0,35	0,23	0,22	0,31	0,44	0,30	0,28	0,33	0,33	0,24	0,48	0,31	0,22	0,26	0,21
IRGA 417	0,48	0,59	0,51	0,39	0,47	0,38	0,61	0,56	0,57	0,52	0,48	0,49	0,70	0,50	0,47	0,64	0,49
IRGA 422 CL	0,42	0,58	0,45	0,33	0,39	0,31	0,55	0,49	0,49	0,45	0,38	0,40	0,68	0,46	0,41	0,58	0,42
PUITÁ INTA CL	0,43	0,57	0,46	0,34	0,45	0,39	0,62	0,51	0,50	0,47	0,41	0,43	0,67	0,45	0,46	0,60	0,45
Sator CL	0,62	0,63	0,49	0,58	0,62	0,65	0,58	0,54	0,56	0,59	0,55	0,56	0,66	0,59	0,60	0,60	0,61

continuação TABELA 22. Distância genética (Nei, 1983) entre 27 populações de arroz vermelho e 4 cultivares de arroz baseada em 24 SSR. Porto Alegre, RS. 2010.

População	Campo Bom	Manoel Viana 1	Harmonia	Manoel Viana 2	Alegrete	Caverá	Agudo 1	Agudo 2	Agudo 3	Agudo 4	IRGA 417	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	Sator CL
Arroio Grande 1														
Arroio Grande 2														
Arroio Grande 3														
Sta Margarida do Sul 1														
Sta Margarida do Sul 2														
São Gabriel 1														
São Gabriel 2														
São Gabriel 3														
São Gabriel 4														
Cacequi 1														
Cacequi 2														
Cacequi 3														
Cacequi 4														
Cacequi 5														
Cacequi 6														
Sto Antônio Patrulha 1														
Sto Antônio Patrulha 2														
Campo Bom	-													
Manoel Viana 1	0,32	-												
Harmonia	0,45	0,38	-											
Manoel Viana 2	0,29	0,13	0,41	-										
Alegrete	0,50	0,21	0,36	0,21	-									
Caverá	0,28	0,13	0,35	0,10	0,19	-								
Agudo 1	0,38	0,28	0,48	0,25	0,38	0,25	-							
Agudo 2	0,28	0,23	0,36	0,22	0,32	0,20	0,22	-						
Agudo 3	0,37	0,18	0,43	0,16	0,30	0,16	0,23	0,16	-					
Agudo 4	0,38	0,25	0,51	0,23	0,34	0,21	0,30	0,22	0,17	-				
IRGA 417	0,78	0,45	0,60	0,45	0,45	0,45	0,49	0,57	0,44	0,45	-			
IRGA 422 CL	0,75	0,39	0,55	0,42	0,36	0,41	0,49	0,54	0,41	0,39	0,18	-		
PUITÁ INTA CL	0,75	0,41	0,58	0,45	0,39	0,44	0,52	0,52	0,40	0,41	0,21	0,21	-	
Sator CL	0,65	0,56	0,55	0,62	0,57	0,62	0,54	0,55	0,53	0,58	0,70	0,66	0,65	-

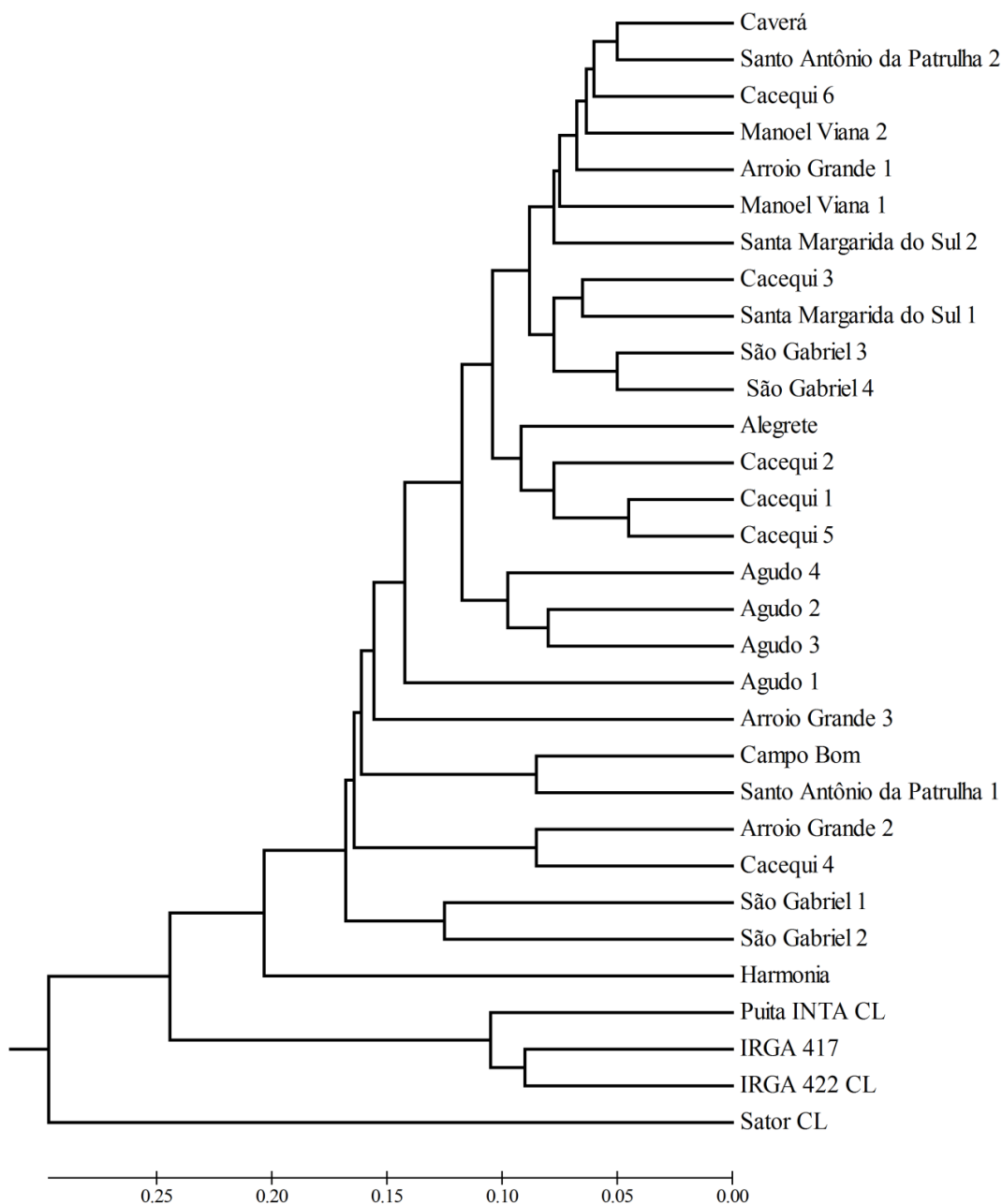


FIGURA 17. Agrupamento das populações de arroz vermelho e cultivares de arroz baseado nas distâncias genéticas de Nei (1983) pelo método UPGMA. Porto Alegre, RS. 2010.

No presente estudo, a cultivar Sator CL foi agrupada em um grupo particular em relação às demais cultivares e às populações de arroz vermelho (Figura 17). O agrupamento de Sator CL em um grupo e das três demais cultivares em outro é explicado por sua origem. Tanto a cultivar IRGA 422 CL quanto a PUITÁ INTA CL têm a IRGA 417 como progenitora (IRGA, 2010; Livore *et al.*, 2007). Por outro lado, a

cultivar Sator CL é um híbrido e tem outros genótipos como genitores. Devido ao fato de ser um híbrido produzido por empresa privada, a genealogia desta cultivar não é disponível, o que limita em parte a discussão dos resultados. O uso da cultivar Sator CL é limitado pela impossibilidade de produção de sementes na própria propriedade. Como a frequência de utilização de Sator CL nas lavouras é baixa, em comparação às demais cultivares resistentes não híbridas, o fluxo gênico a partir desta cultivar é menor e seus alelos são pouco compartilhados com as populações de arroz vermelho. Isso explica a maior distância genética desta cultivar para as outras populações amostradas. Por outro lado, o agrupamento das populações de arroz vermelho proximamente às demais cultivares pode ser explicado pelo tempo de uso comercial da cultivar IRGA 417 e pela origem genética das cultivares IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL. A cultivar IRGA 417 está sendo utilizada comercialmente desde 1998 no RS (MAPA, 2011) e seus alelos podem ter sido transmitidos para as populações de arroz vermelho através de fluxo gênico. Os resultados da genotipagem de acessos de arroz vermelho e cultivares de arroz no item 4.1 embasam esta teoria. Como a cultivar IRGA 422 CL quanto a PUITÁ INTA CL tem como genitora a cultivar IRGA 417 (Livore *et al.*, 2007; IRGA, 2010), é esperado que estas compartilhem alelos e sejam agrupadas proximamente em estudos genéticos.

O teste de Mantel (Smouse *et al.*, 1986) foi realizado para determinar a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas a partir dos pontos obtidos de cada coleta pelo equipamento GPS (Figura 18). O resultado do teste de Mantel indicou que não há correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas das populações de arroz vermelho estudadas. O coeficiente de determinação (R^2) estimado pelo teste através de 9999 permutações foi de 0,06 (Figura 18). Certas populações de arroz vermelho próximas geograficamente (e.g. de um mesmo município) foram

alocadas em subgrupos distintos no dendograma, como as populações oriundas de São Gabriel, Santo Antônio da Patrulha, Cacequi e Agudo (Figuras 16 e 17). Por outro lado, certas populações distantes geograficamente (e.g. de municípios distintos) foram alocadas no mesmo subgrupo. Isso ocorreu com as populações Arroio Grande 2 e Cacequi 4 e com Caverá e Santo Antônio da Patrulha 2 (Figuras 16 e 17).

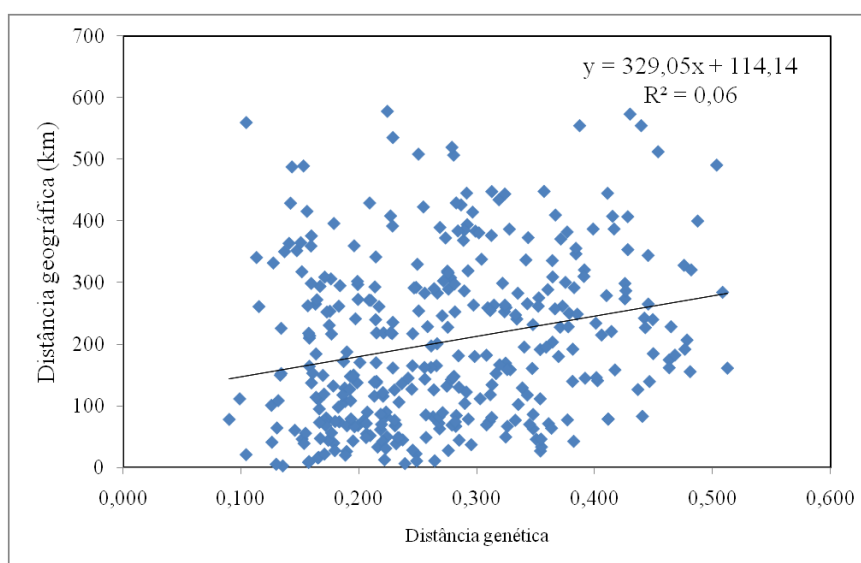


FIGURA 18. Correlação entre distância genética de Nei (1983) e distância geográfica de 27 populações de arroz vermelho calculada pelo teste de Mantel. Porto Alegre, RS. 2010.

O resultado obtido com o teste de Mantel foi diferente do observado em estudos anteriores nos quais houve correlação entre as distâncias genéticas e geográficas de populações de arroz vermelho como na China (Xia *et al.*, 2011) e em outros países (Gealy *et al.*, 2009). Entretanto, no trabalho desenvolvido por Gealy *et al.* (2009) não houve correlação entre estas distâncias quando a análise foi realizada com todos os dados. Neste estudo, houve correlação apenas quando o agrupamento foi realizado por coleção. Isto pode ocorrer pela alta variabilidade genética dentro das populações. Além do fluxo gênico discutido anteriormente, que afeta a variabilidade genética de populações de arroz vermelho, diferentes ambientes podem afetar a diferenciação destas

populações (Hartl & Clark, 2007). Entretanto, as populações avaliadas no presente estudo foram obtidas em locais onde o cultivo do arroz é realizado em sistema semelhante. No RS o cultivo de arroz predominante é o irrigado por inundação, realizado uma vez por ano com rotação de culturas praticamente inexistente devido ao tipo de solo hidromórfico em que o arroz é cultivado. Assim, é esperado que o fator ambiental exerça influência menor em comparação ao fluxo gênico (Xia *et al.*, 2011). Estes resultados reforçam a hipótese da ocorrência de fluxo gênico a partir das cultivares utilizadas na época da amostragem ou entre populações de arroz vermelho do presente estudo, conforme mencionado anteriormente. Os resultados obtidos com a análise de UPGMA e a correlação entre distância genética e distância geográfica corroboram com os resultados observados na AMOVA indicando menor diferenciação genética destas populações em relação à populações de arroz vermelho de outros locais.

Com o objetivo de avaliar as relações entre os indivíduos de cada população de arroz vermelho e das cultivares de arroz foi realizada a análise de componentes principais (ACP) a partir da matriz de distância genética de Nei (1978) dos 24 *loci* SSR nos 538 indivíduos. Os resultados da ACP indicaram que as populações foram agrupadas em três grupos, havendo uma interface entre dois deles com indivíduos localizados de forma intermediária (Figura 19). As cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL foram agrupadas proximamente entre si, enquanto que Sator CL, embora no mesmo grupo, apresentou certa distância das demais (Figura 19). Este resultado corroborou com o encontrado no dendograma UPGMA (Figura 17). Alguns indivíduos da população Agudo 3 foram estreitamente associados com as cultivares. Entretanto, alguns indivíduos desta população apresentaram baixa associação com as cultivares e com outros indivíduos da própria população (Figura 17). Isso ocorreu ainda com as populações Agudo 2 e Agudo 3. Provavelmente, estes indivíduos são originados

de introduções advindas 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. Outras populações cujos indivíduos foram alocados no mesmo grupo das cultivares foram Harmonia e Agudo 4 (Figura 17). A população Cacequi 3 apresentou indivíduos nos três grupos. Entretanto, as populações Campo Bom e São Gabriel 4 tiveram todos os indivíduos agrupados em somente um grupo cada (Figura 17). Em sua maioria, as populações de arroz vermelho estudadas são geneticamente relacionadas, pois houve o posicionamento de indivíduos de uma mesma população em mais de um grupo, indicando fluxo gênico entre populações. Ainda, não houve clara distinção entre a distância geográfica das populações e sua distância genética, havendo populações de locais distantes alocadas em grupos iguais (Figuras 16 e 17). Este resultado corrobora com o encontrado no teste de Mantel que mostrou não haver considerável correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. Além disso, a ACP mostrou que embora exista associação com as cultivares, grande parte dos indivíduos de arroz vermelho foram mais associados entre si (Figura 19). Os resultados da ACP do presente estudo diferiram dos resultados encontrados em populações de arroz vermelho dos EUA nas quais o agrupamento dos indivíduos nessa análise foi mais discriminante (Gealy *et al.*, 2009; Shivrain *et al.*, 2010a). Os resultados da ACP do presente estudo podem ser atribuídos a fatores como, por exemplo, a troca de sementes entre populações que faz com que indivíduos migrantes estejam em uma população, porém sejam geneticamente pertencentes à outra. Associado a este fato está a capacidade de dormência que as sementes de arroz vermelho possuem, garantindo sua permanência por um longo período no local de imigração.

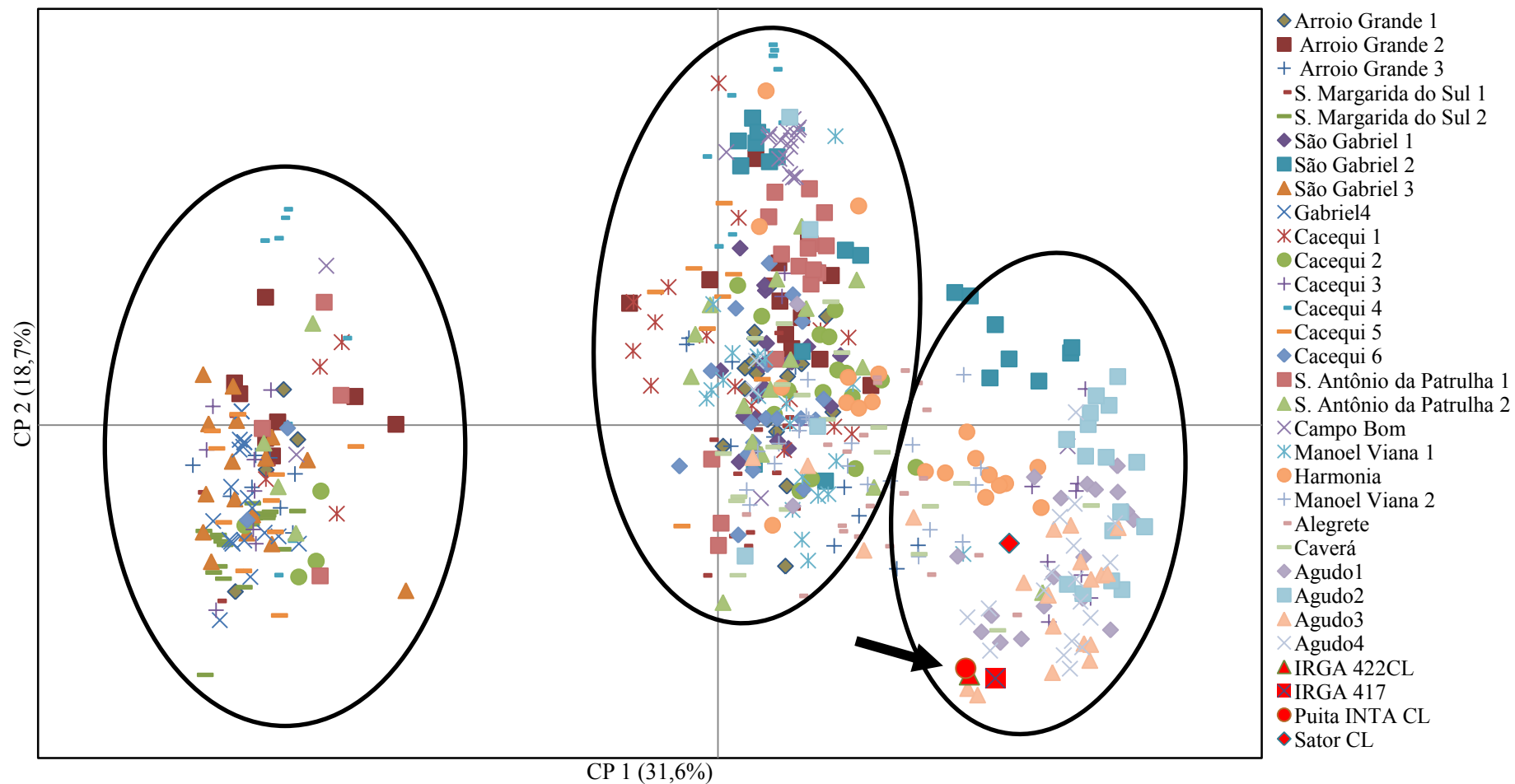


FIGURA 19. Análise de componentes principais de 27 populações de arroz vermelho e 4 cultivares de arroz usando 24 marcadores SSR e baseada na distância genética de Nei (1978). A seta preta indica a posição das cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL. As elipses indicam os três grupos definidos pela análise. Porto Alegre, RS. 2010.

As sementes de uma mesma planta de arroz vermelho podem não germinar ao mesmo tempo, de forma que algumas permanecem por vários anos no solo até um momento oportuno (Gu *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2006). Assim, sementes dormentes que eventualmente germinaram anos depois de sua formação podem inserir na população via fluxo de pólen alelos presentes em baixa frequência ou mesmo inexistentes na população atual (Oard *et al.*, 2000; Koornneef *et al.*, 2002). O mesmo pode ocorrer com sementes oriundas de lavouras distintas. Conjuntamente, estes fatores explicam porque a análise ACP foi consideravelmente diferente da análise de UPGMA. O agrupamento no dendograma foi realizado a partir de distâncias genéticas obtidas por população, enquanto a APC foi realizado por indivíduo. Assim, fatores que expliquem a variação individual se aplicam mais à ACP.

A análise da estrutura das populações de arroz vermelho foi realizada para prover evidências sobre a ancestralidade comum entre elas, a partir da designação uma população K na qual os indivíduos se enquadram (Pritchard *et al.*, 2000). Esta análise é útil porque fornece detalhes sobre a origem genética compartilhada pelas populações e não somente a relação entre estas (Gealy *et al.*, 2009). Assim, a análise de estrutura é complementar às análises UPGMA e ACP. No presente estudo esta análise proporcionou a realização de inferências sobre o fluxo gênico entre as populações e sobre a origem da resistência aos herbicidas imidazolinonas das populações de arroz vermelho. Para tanto, foi realizada fenotipagem quanto à resistência a estes herbicidas, cujos resultados são apresentados na Tabela 24. Foram testados valores de K variando de 1 a 10, com cinco repetições cada. Baseado na estatística *ad hoc* proposta por Evanno *et al.* (2005) os indivíduos estudados foram melhor ajustados em K=6 (Figura 20). A Tabela 23 mostra a proporção em que cada população foi designada em cada um dos grupos K.

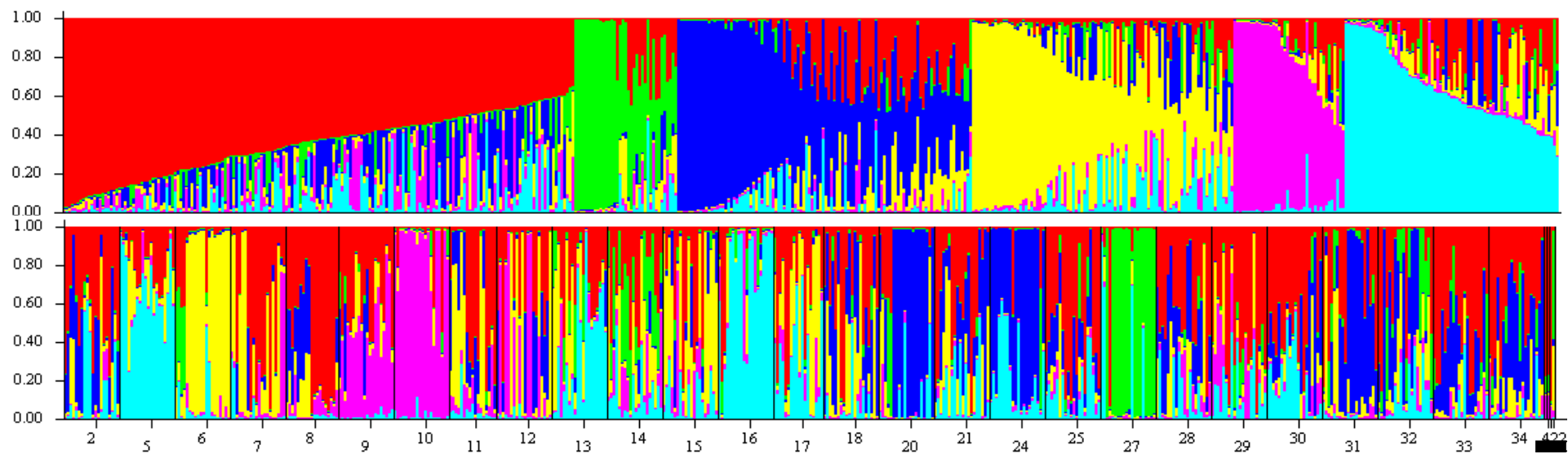


FIGURA 20. Composição genética de 533 indivíduos de arroz vermelho e quatro cultivares de arroz do Rio Grande do Sul, agrupados em seis grupos (K=6), baseado em 24 marcadores SSR. As cores referentes a cada grupo são vermelho=K1, verde=K2, azul=K3, amarelo=K4, rosa=K5 e ciano=K6. Cada indivíduo é representado por uma coluna e as cores representam a contribuição de cada grupo K definido. Acima, os indivíduos estão ordenados por grupo de maior contribuição. Abaixo, a ordenação é baseada nas populações amostradas conforme numeração da Figura 16. As cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL foram localizadas no grupo K1 e Sator CL no grupo K2. A barra preta abaixo da figura indica as posições das cultivares na figura inferior. Porto Alegre, RS. 2010.

A análise da estrutura das populações confirmou a ancestralidade comum entre as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL ao colocá-las juntas no grupo K1 (Figura 20 e Tabela 23). A divisão da cultivar Sator CL em dois grupos K2 e K4 é condizente com a origem híbrida desta cultivar. Isso indica que a estruturação realizada com $K=6$ teve significado biológico aceitável e segundo Chung & Park (2010) este é um fator que também deve ser levado em conta na definição do número K considerado ideal na análise.

TABELA 23. Proporção de associação de 27 populações de arroz vermelho e 4 cultivares de arroz em cada grupo (K) definido pelo *software* Structure. As cores entre parênteses são correspondentes com as apresentadas na Figura 20. Porto Alegre, RS. 2010.

População	Grupo					
	K1 (vermelho)	K2 (verde)	K3 (azul)	K4 (amarelo)	K5 (rosa)	K6 (ciano)
2 Arroio Grande 1	0,44	0,02	0,26	0,13	0,03	0,14
5 Arroio Grande 2	0,17	0,01	0,01	0,14	0,03	0,65
6 Arroio Grande 3	0,10	0,10	0,01	0,70	0,02	0,06
7 Santa Margarida do Sul 1	0,45	0,01	0,05	0,35	0,10	0,04
8 Santa Margarida do Sul 2	0,62	0,01	0,21	0,10	0,06	0,01
9 São Gabriel 1	0,36	0,02	0,09	0,09	0,42	0,02
10 São Gabriel 2	0,07	0,02	0,01	0,04	0,85	0,02
11 São Gabriel 3	0,38	0,01	0,19	0,30	0,08	0,05
12 São Gabriel 4	0,26	0,01	0,18	0,24	0,30	0,02
13 Cacequi 1	0,24	0,09	0,02	0,23	0,05	0,37
14 Cacequi 2	0,26	0,28	0,04	0,20	0,11	0,12
15 Cacequi 3	0,23	0,03	0,10	0,45	0,10	0,10
16 Cacequi 4	0,09	0,05	0,01	0,05	0,08	0,72
17 Cacequi 5	0,30	0,02	0,01	0,33	0,06	0,28
18 Cacequi 6	0,31	0,03	0,33	0,25	0,02	0,06
20 Santo Antônio da Patrulha 1	0,09	0,06	0,67	0,08	0,02	0,09
21 Santo Antônio da Patrulha 2	0,36	0,02	0,29	0,18	0,02	0,15
24 Campo Bom	0,04	0,04	0,68	0,01	0,01	0,22
25 Manoel Viana 1	0,54	0,04	0,19	0,06	0,04	0,14
27 Harmonia	0,06	0,76	0,01	0,02	0,01	0,14
28 Manoel Viana 2	0,41	0,02	0,28	0,14	0,06	0,10
29 Alegrete	0,53	0,05	0,01	0,12	0,15	0,15
30 Caverá	0,46	0,02	0,21	0,07	0,04	0,19
31 Agudo 1	0,28	0,06	0,48	0,14	0,02	0,02
32 Agudo 2	0,22	0,18	0,31	0,13	0,05	0,12
33 Agudo 3	0,53	0,07	0,26	0,06	0,03	0,04
34 Agudo 4	0,41	0,06	0,35	0,11	0,04	0,03
IRGA 417	0,78	0,09	0,00	0,01	0,12	0,00
IRGA 422 CL	0,77	0,09	0,00	0,02	0,12	0,00
PUITÁ INTA CL	0,91	0,01	0,00	0,01	0,07	0,00
Sator CL	0,02	0,57	0,03	0,34	0,03	0,01

TABELA 24. Caracterização fenotípica de 27 populações de arroz vermelho quanto à resistência aos herbicidas imidazolinonas. Porto Alegre, RS. 2010.

População	Controle médio (%)	Nível de resistência	Mutação detectada
AVS	99,7	Baixo	-
AVR	2,7	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
2 Arroio Grande 1	10,0	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
5 Arroio Grande 2	10,4	Alto	Gly ₆₅₄ Glu/Ser ₆₅₃ Asn
6 Arroio Grande 3	3,0	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
7 Santa Margarida do Sul 1	7,3	Alto	Gly ₆₅₄ Glu/Ala ₁₂₂ Thr
8 Santa Margarida do Sul 2	7,0	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
9 São Gabriel 1	15,0	Médio	Gly ₆₅₄ Glu
10 São Gabriel 2	83,3	Baixo	-
11 São Gabriel 3	11,8	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
12 São Gabriel 4	1,5	Alto	Outra/Gly ₆₅₄ Glu
13 Cacequi 1	0,3	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
14 Cacequi 2	4,2	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
15 Cacequi 3	5,0	Alto	Gly ₆₅₄ Glu/Ala ₁₂₂ Thr
16 Cacequi 4	87,0	Baixo	-
17 Cacequi 5	2,3	Alto	Gly ₆₅₄ Glu/Ala ₁₂₂ Thr
18 Cacequi 6	14,3	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
20 Santo Antônio da Patrulha 1	88,8	Baixo	-
21 Santo Antônio da Patrulha 2	0,0	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
24 Campo Bom	64,3	Médio	Gly ₆₅₄ Glu/Ser ₆₅₃ Asn
25 Manoel Viana 1	14,5	Alto	Gly ₆₅₄ Glu/Ser ₆₅₃ Asn
27 Harmonia	98,5	Baixo	-
28 Manoel Viana 2	10,5	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
29 Alegrete	5,0	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
30 Caverá	9,5	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
31 Agudo 1	5,5	Alto	Gly ₆₅₄ Glu/Ser ₆₅₃ Asn
32 Agudo 2	67,4	Médio	-
33 Agudo 3	16,3	Alto	Gly ₆₅₄ Glu
34 Agudo 4	10,8	Alto	Gly ₆₅₄ Glu

¹Baixo>85%, 85%>médio>15%, alto>15% de controle.

²AVS, arroz vermelho suscetível. AVR, arroz vermelho resistente a imidazolinonas.

A maior parte dos indivíduos de arroz vermelho pertenceu ao grupo K1 (Figura 20). As populações Santa Margarida do Sul 2, Manoel Viana 1, Alegrete e Agudo 3 tiveram mais de 0,5 de associação ao grupo K1 (Tabela 23). Estas populações são resistentes a herbicidas e a sua alta proporção de associação no grupo K1 indica a ocorrência de possível fluxo gênico com as cultivares. Entretanto, a população Agudo 2 teve 0,22 de associação ao grupo K1, e foi fenotipada como médio nível de resistência, além de não ter sido detectada mutação no gene da ALS em seus indivíduos (Tabela 24). O agrupamento desta 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 cultivares. Este fluxo gênico provavelmente ocorreu a partir da cultivar IRGA 417, e não com as cultivares IRGA 422 CL ou PUITÁ INTA CL.

Os resultados obtidos apontam a estreita base genética das cultivares mais utilizadas no RS nos últimos anos. Conforme discutido anteriormente, as cultivares IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL foram originadas a partir da cultivar IRGA 417 (Livore *et al.*, 2007; IRGA, 2010). Este fato foi confirmado também pela análise das distâncias genéticas ilustradas pelo UPGMA (Figura 17). A utilização contínua destas cultivares pode resultar na seleção de indivíduos de arroz vermelho com características semelhantes à estas (Cao *et al.*, 2006). Além disso, o fluxo gênico mesmo em baixas taxas, como a observada no experimento discutido no item 4.2.1, tem um efeito considerável quando vários anos de cultivo sucessivos com as mesmas cultivares são realizados. A resistência a herbicidas imidazolinonas é um caráter que pode ser selecionado ao ser incorporado nas populações de arroz vermelho devido à utilização destes herbicidas e à introgressão através de fluxo gênico entre plantas de arroz vermelho (ver item 4.2.1). Isso explica porque muitos acessos resistentes a imidazolinonas foram agrupados no mesmo grupo K que as cultivares resistentes.

Por outro lado, era esperado que quando ocorresse baixa associação ao grupo das cultivares K1 as populações fossem suscetíveis a herbicidas imidazolinonas. Isso porque a utilização das cultivares resistentes, sobretudo IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL, tem sido alta nos últimos anos em comparação com cultivares suscetíveis. Juntas, estas cultivares foram semeadas em quase 50% da área destinada ao arroz em 2009 (IRGA, 2010). De fato, as populações São Gabriel 2, Cacequi 4, Santo Antônio da Patrulha 1 e Harmonia tiveram menos de 0,1 de associação ao grupo K1 e todas foram fenotipadas como baixo nível de resistência (Tabela 23 e 24). Entretanto, a população

Campo Bom teve 0,04 de associação ao grupo K1 (Tabela23), contudo sua fenotipagem apontou com sendo medianamente resistente (Tabela 24). Isso é explicado pela presença de indivíduos resistentes nesta população. Embora esta população tenha apresentado nível de resistência médio, na média dos indivíduos amostrados, dois destes tiveram alto nível de resistência, um contendo a mutação Gly₆₅₄Glu e outro contendo Ser₆₅₃Asn. Os indivíduos contendo a mutação Gly₆₅₄Glu tiveram aproximadamente 0,45 de associação com o grupo K1 e 0,44 com o grupo K3 (vide Apêndice 5 para detalhe individual). Isso indica a possibilidade deste indivíduo ser um híbrido entre arroz vermelho e uma das cultivares resistentes. Ainda, pode ter ocorrido fluxo entre um indivíduo já resistente e outro suscetível. Por outro lado, o indivíduo portando a mutação Ser₆₅₃Asn foi associado aos grupos K3 e K6 com proporções de 0,59 e 0,36 respectivamente (Apêndice 5). Estes grupos não foram os mesmos onde a cultivar Sator CL foi classificada, sugerindo assim, que este indivíduo seja resistente devido à seleção independente de resistência. Esta hipótese é reforçada pelo fato de três populações de arroz vermelho suscetíveis estarem associadas também aos grupos K3 e K6 em proporções superiores a 0,65 (Tabelas 23 e 24).

Estes resultados sugerem que as mutações encontradas nos acessos de arroz vermelho estudados tenham origem devido ao fluxo gênico entre plantas resistentes e suscetíveis ou à processos de seleção independente pelo uso continuado de herbicidas imidazolinonas. Isto foi evidenciado no item 4.1 onde ambos processos foram detectados em acessos de arroz vermelho coletados no ano agrícola de 2007/2008. Conforme discutido no item 4.1, as mutações presentes em cultivares de arroz podem ocorrer em plantas daninhas independentemente de fluxo gênico. Por exemplo, foram identificadas até o momento seis espécies de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores de ALS cuja mutação é Ala₁₂₂Thr (Roso *et al.*, 2010a; Tanel *et al.*, 2011).

Ainda, duas espécies resistentes a estes herbicidas foram identificadas portando a mutação Ser₆₅₃Asn (Tranel et al. 2011) presente na cultivar Sator CL. Em plantas de arroz vermelho do RS, estas mutações foram identificadas por Roso *et al.* (2010a), sendo sua origem ainda desconhecida. Entretanto, a mutação Gly₆₅₄Glu, presente na cultivar IRGA 422 CL ocorreu naturalmente em acessos de arroz vermelho do Arkansas, EUA (Sales *et al.*, 2008) e do RS (ver item 4.1). Conforme mencionado anteriormente, os resultados do presente estudo sugerem que a mutação Ser₆₅₃Asn, presente na cultivar Sator CL, ocorreu naturalmente em acessos de arroz vermelho do RS coletados no ano agrícola de 2009/2010.

As populações de São Gabriel 1 e São Gabriel 2 que são geograficamente próximas, apresentaram relações genéticas estreitas e foram agrupadas proximamente na análise UPGMA (Figura 17) e na ACP (Figura 19). Entretanto, na análise de estrutura estas populações foram alocadas em grupos distintos (Figura 20). Isso é explicado pelo fato de a população São Gabriel 1 ser resistente e a São Gabriel 2 ser suscetível aos herbicidas imidazolinonas (Tabela 24). Provavelmente houve fluxo gênico entre as cultivares resistentes e indivíduos da população São Gabriel 1 ou entre indivíduos de arroz vermelho oriundo de outros locais. As populações Cacequi 1, 2 e 6, e São Gabriel 3 e 4 apresentaram alto grau de mistura entre os K (Figura 20). Nestas populações a proporção destinada a pelo menos três grupos K foram em torno de um terço (Tabela 23). Ainda, as populações de Arroio Grande 1, Caverá, Agudo 2 e Manoel Viana 2 também seguiram este padrão, sendo, entretanto, mesclas entre dois grupos K distintos (Figura 20).

O resultado discutido acima indica possíveis eventos de migração através de sementes entre populações de arroz vermelho. Isto seria possível através da utilização de sementes de arroz contaminadas com arroz vermelho, por exemplo. Em estudo com

117 orizicultores do RS identificou-se que menos de 10% da semente utilizada era fiscalizada ou básica (Marchezan *et al.*, 2001). Além disso, os autores apontaram que 36% das sementes adquiridas foram provenientes de comércio geral sem informação comprovada de origem. Ainda, 83% das amostras de sementes de arroz estavam contaminadas com arroz vermelho, variando de 1 a mais de 20 sementes por amostra (Marchezan *et al.*, 2001). Em outro estudo foi avaliada a resistência aos herbicidas imidazolinonas em acessos de arroz vermelho coletados em lotes de sementes de arroz sem origem (Ferreira *et al.*, 2009). Neste estudo, 38% das amostras continham acessos de arroz vermelho resistentes à imidazolinonas. Foi encontrado arroz vermelho resistentes em 16 e 44% das amostras de sementes sem origem de IRGA 417, IRGA 422 CL respectivamente (Ferreira *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que o fluxo de sementes resistentes de arroz vermelho ocorra principalmente devido ao uso de sementes sem origem contaminadas. Outros fatores que atuariam no fluxo de sementes entre lavouras seriam a dispersão por pássaros, a terceirização ou compartilhamento de máquinas, trocas de sementes entre agricultores ou outras. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar e dimensionar a importância relativa destes fatores.

Diversos estudos têm alertado em relação ao perigo que fluxo gênico entre plantas cultivadas e espécies correlatas representa para a sustentabilidade da produção de alimentos e para a biodiversidade (Ellstrand, 2003; Carrie & Loren, 2004; Lu & Snow, 2005; Gressel & Valverde, 2009; Huangfu *et al.*, 2011). Além disso, outras implicações do fluxo gênico podem ocorrer como a alteração na adaptação das plantas daninhas e limitação do controle de plantas daninhas pela evolução da resistência aos herbicidas conforme discussão apresentada nos itens 4.1.2 e 4.3.

O presente trabalho forneceu novas informações em relação à resistência de arroz vermelho e o uso de cultivares de arroz resistentes a imidazolinonas. Os resultados

obtidos pela AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), UPGMA, ACP e pela análise estrutura genética obtida pelo *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000) mostraram haver fluxo gênico entre plantas de cultivares resistentes e possivelmente indivíduos de arroz vermelho já resistente para outras populações de arroz vermelho. Portanto, esta pode ser a origem predominante da resistência aos herbicidas imidazolinonas em arroz vermelho no RS. Cabe ressaltar a ocorrência de populações contendo mais de uma mutação conferindo resistência aos inibidores de ALS (Tabela 24). Isto foi encontrado em outro trabalho, no qual populações de arroz vermelho do RS apresentaram três mutações distintas no gene da enzima ALS, todas encontradas nas cultivares IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL (Roso *et al.*, 2010a).

O método utilizado no presente estudo foi mais informativo que os utilizados em pesquisas anteriores realizadas no Brasil, sobretudo em se tratando da resistência de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas. As populações de arroz vermelho do Brasil foram caracterizadas bioquímica e geneticamente (Malone *et al.*, 2007) e morfológicamente (Menezes *et al.*, 2002; Schwanke *et al.*, 2008). Entretanto, os dados foram menos explorados pelos métodos de análise empregados de forma que restritas inferências sobre evolução das populações estudadas puderam ser realizadas. Por outro lado, métodos semelhantes foram utilizados em populações de arroz vermelho de outros locais do mundo (Londo & Schaal, 2007; Gealy *et al.*, 2009; Shivrain *et al.*, 2010a). 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. Por exemplo, estudando acessos de arroz vermelho de diversos estados americanos, Gealy *et al.* (2009) não encontraram alelos compartilhados entre estes acessos e cultivares de arroz resistentes aos herbicidas. Neste trabalho, os acessos utilizados foram obtidos de coletas antigas realizadas entre 1994 e

2001 (Gealy *et al.*, 2009), antes do uso de cultivares resistentes nas áreas de cultivo amostradas. Além destes, outros trabalhos estudaram populações de arroz vermelho com métodos semelhantes ao utilizados no presente estudo, com variações relacionadas ao objetivo principal de cada trabalho (Cao *et al.*, 2006; Chung & Park, 2010; Reagon *et al.*, 2010).

As informações geradas por trabalhos como este são importantes porque permitem entender como o arroz vermelho tem evoluído em razão de diversas situações. Além disso, o surgimento de populações de arroz vermelho resistente às imidazolinonas representa um alerta, sobretudo em função do fluxo gênico que venha a ocorrer a partir das cultivares de arroz resistente ou de arroz vermelho já resistente a estes herbicidas. Outro fator importante a ser levado em conta é a seleção de mutações impostas pelo uso continuado de herbicidas do mesmo grupo que igualmente permite a evolução da resistência em arroz vermelho. Assim, o alto grau de proximidade genética entre o arroz vermelho e as cultivares de arroz por todo o mundo demonstrado por trabalhos como este devem servir de aprendizado, principalmente em relação à utilização de cultivares de arroz resistentes aos herbicidas.

Além das cultivares de arroz resistentes a herbicidas imidazolinonas, outras estão em desenvolvimento há algum tempo. Por exemplo, está em processo final de desenvolvimento cultivares transgênicas de arroz resistentes ao herbicida glufosinato de amônio, através da inserção do gene BAR (Michiels & Johnson, 2001; Gealy *et al.*, 2003). Em 2009, a utilização desta cultivar no Brasil foi vetada em votação que envolveu representantes de diversos setores relacionados com a cultura do arroz, incluindo instituições de pesquisa como a Embrapa e o IRGA, além dos produtores de arroz do RS. Embora sua utilização ainda não tenha sido liberada no Brasil, trabalhos apontaram ocorrência de fluxo gênico de linhagens de arroz resistentes à glufosinato de

amônio para arroz vermelho (Noldin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2009). Também está em desenvolvimento linhagens de arroz resistentes ao herbicida glyphosate (Gealy *et al.*, 2003). Nestas linhagens, a resistência ao glyphosate é alcançada através de inserção do gene da enzima EPSPS (5-enolpiruvoil-shikimato-3-fosfato sintetase) de *Agrobacterium* sp. (Gealy *et al.*, 2003) e de *Salmonella typhimurium* (Cao *et al.*, 2004). Foi identificado um gene de EPSPS de arroz mutante conferindo resistência ao glyphosate (Zhou *et al.*, 2006). O processo de mutação foi realizado artificialmente através do método *error-prone* PCR (Pritchard *et al.*, 2005). Entretanto, este gene mutante foi utilizado somente em plantas de tabaco (Zhou *et al.*, 2006). Além destes casos, cuja resistência ao glyphosate é devido ao local de ação alterado, plantas de arroz resistentes a este herbicida através de metabolização por glutathione S transferase foram obtidas pela superexpressão dessa enzima (Hu *et al.*, 2009).

A resistência de linhagens de arroz aos herbicidas inibidores da PROTOX também tem sido obtidas através da inserção do gene desta enzima em cultivares de arroz (Jung *et al.*, 2008). Estas linhagens apresentaram altos níveis de resistência aos herbicidas oxyfluorfen, acifluorfen, carfentrazone, pyraflufen e oxadiazon, contudo, apresentaram alteração negativa na adaptação em diversos parâmetros avaliados (Jung *et al.*, 2010). Entretanto, com base nos resultados de estudos realizados sobre o tema fluxo gênico em arroz, não é possível garantir que cultivares de arroz resistentes a herbicidas de outros mecanismos de ação não irão transferir seus alelos às populações de arroz vermelho a exemplo do que vem ocorrendo com àquelas resistentes às imidazolinonas.

Algumas estratégias baseadas em biotecnologia vêm sendo propostas para mitigar o fluxo gênico entre cultivares de arroz resistentes aos herbicidas e arroz

vermelho. Uma destas estratégias seria a minimização da fecundação cruzada entre as plantas. Para tanto, tem sido proposta a utilização do gene *superwoman-1-cleistogamy* (*spw-1*) (Yoshida *et al.*, 2007). Este gene confere às plantas de arroz portadoras cleistogamia total e assim estas apresentam completa autofecundação (Yoshida *et al.*, 2007). Diversos parâmetros morfológicos (e.g. tamanho do estigma, exserção de estames) e reprodutivos (e.g. fertilidade) foram testados a fim de testar a viabilidade de linhagens transgênicas portadoras do *spw-1* (Yoshida *et al.*, 2007). Os autores mostraram que o desempenho das plantas transgênicas não foi inferior ao das plantas silvestres e por isso esta poderia ser uma ferramenta para mitigar o fluxo gênico. Entretanto, a tendência de utilização de cultivares de arroz híbridas é vista como um empecilho à utilização do gene *spw-1* (Gressel & Valverde, 2009).

Outra estratégia de mitigação do fluxo gênico consiste em inserir transgenes que conferem resistência aos herbicidas no DNA cloroplastidial das plantas. Esta possibilidade tem sido mostrada para plantas superiores em diversos trabalhos (Bock, 2001; Daniell, 2002; Maliga, 2004). A principal vantagem neste método é a transmissão limitada do transgene através do pólen, pois os cloroplastos são herdados via herança materna e dessa forma os grãos de pólen não possuiriam o transgene. Entretanto, uma limitação desta proposta no caso do arroz é que plantas de arroz vermelho mais altas poderiam polinizar flores das cultivares e gerar híbridos portadores do transgene. Uma vez que estes híbridos sejam polinizados novamente por arroz vermelho, o transgene estará incorporado ao arroz vermelho (Gressel & Valverde, 2009). Embora esta possibilidade seja pequena, mesmo taxas de fluxo gênico da ordem de 0,01% são representativas devido ao grande número de plantas em áreas de cultivo de arroz (ver item 4.3).

Outras estratégias relacionadas à genes de resistência aos herbicidas inseridos em cultivares em construtos em tandem com um segundo gene (Gressel, 1999). Tal gene seria neutro ou vantajoso para a cultivar ou desvantajoso para a espécie correlata (Gressel, 1999). Por exemplo, genes conferindo nanismo poderiam ser utilizados como segundo gene, pois os híbridos oriundos de fluxo gênico teriam negativa adaptação em relação aos indivíduos silvestres. Existem diversos genes que causam nanismo em plantas de arroz (Spielmeyer *et al.*, 2002; Qiao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Neste caso, híbridos de arroz vermelho e arroz cultivado teriam competitividade diminuída em relação ao arroz vermelho, mas não com as cultivares de arroz. Outros genes que poderiam ser incorporados à resistência aos herbicidas em arroz são aqueles que impedem o degrane de sementes (Onishi *et al.*, 2007; Thurber *et al.*, 2010). A incorporação de genes de nanismo e antidegrane em tandem com a resistência aos herbicidas foi sugerido por Gressel e Valverde (Gressel & Valverde, 2009). Segundo estes autores, os híbridos com arroz vermelho seriam dominantes para o nanismo e não apresentariam degrane. Assim, estes híbridos seriam menos competitivos e menos sementes restariam para o banco de sementes do solo. Esta estratégia foi demonstrada em Tabaco (Al-Ahmad *et al.*, 2005) e *Brassica napus* (Al-Ahmad & Gressel, 2006).

A mitigação da introgressão do transgene através de gene conferindo suscetibilidade de plantas de arroz ao herbicida bentazon foi proposta recentemente (Lin *et al.*, 2008). Neste modelo, as plantas de arroz são naturalmente tolerantes ao bentazon devido à oxidação e conseqüente inativação deste herbicida por enzimas citocromo P450, codificada pelo gene CYP81A6. A nova estratégia consistiu na inserção do gene de interesse, no caso um gene de EPSPS insensível ao glyphosate, em tandem com o gene antisense de CYP81A6 (Lin *et al.*, 2008). Isto conferiu a resistência ao glyphosate e ao mesmo tempo a suscetibilidade ao bentazon. Potenciais híbridos de

arroz vermelho e plantas de arroz transgênicas voluntárias poderiam, dessa forma, serem controlados com o herbicida bentazon no próximo ano agrícola. Entretanto, plantas silvestres de arroz vermelho continuariam tolerantes ao bentazon e não seriam controladas e dessa forma, métodos usuais de controle do arroz vermelho deveriam ser utilizados. Por outro lado, foi proposta uma extensão desta abordagem, na qual diferentes cultivares transgênicas de arroz teriam os genes de resistência ao glyphosate, ao glufosinato de amônio e o antisenso de CYP81A6 conferindo suscetibilidade ao bentazon (Gressel & Valverde, 2009). Os autores propuseram a utilização alternada das cultivares transgênicas, o que permitiria uma rotação dos três herbicidas envolvidos e o controle tanto de plantas voluntárias como de híbridos de arroz vermelho e cultivares. Uma limitação apontada é que no sistema proposto o controle de arroz vermelho silvestre não poderia ser realizado seletivamente à cultura a cada seis cultivos de arroz (Gressel & Valverde, 2009). Entretanto, isto é uma teoria e carece de pesquisas que indiquem a viabilidade e real aplicabilidade desta estratégia.

As estratégias que vem sendo desenvolvidas poderão auxiliar os agricultores na manutenção das populações de arroz vermelho em densidades toleráveis. Entretanto, métodos convencionais de controle do arroz vermelho, mesmo que menos eficientes em comparação com controle seletivo por herbicidas, devem ser continuamente estudados e adaptados às novas condições. Seu uso deve ainda ser estimulado entre os agricultores que, em face do controle total do arroz vermelho com herbicidas seletivos, eventualmente deixam de utilizar outras ferramentas de controle. Os métodos convencionais de controle do arroz vermelho bem como da mitigação do fluxo gênico a partir de cultivares de arroz foram discutidos em outros itens dessa dissertação (ver 4.2.1 e 4.3).

Os resultados do presente estudo permitem entender a dinâmica das populações de arroz vermelho no RS. Baseado na estreita relação genética entre as cultivares e as populações de arroz vermelho estudadas, é possível inferir que o fluxo gênico entre estas plantas esteja ocorrendo. Existem populações resistentes aos herbicidas imidazolinonas oriundas a partir de fluxo gênico entre as cultivares de arroz resistentes a estes herbicidas. Além disso, os resultados sugerem haver fluxo gênico de sementes de arroz vermelho entre locais, o que pode favorecer a introgressão dos alelos de resistência a outras populações de arroz vermelho suscetíveis. As populações suscetíveis encontradas neste estudo são geneticamente distintas das populações resistentes. Esses resultados, tomados conjuntamente, suportam a hipótese de que a resistência das populações estudadas seja principalmente devida ao fluxo gênico. No entanto, processos independentes de evolução da resistência a herbicidas em arroz vermelho também foram encontrados, indicando a necessidade de adoção de medidas que resultem na diminuição da pressão de seleção em cada lavoura individualmente.

São necessários estudos futuros para determinar a origem das populações de arroz vermelho de outros locais do Brasil e suas relações entre si e entre as cultivares. Ainda, estudos que visem determinar as rotas de fluxo gênico através de sementes seriam igualmente importantes (Estoup & Guillemaud, 2010). Para tanto, sugere-se a utilização de maior número de marcadores moleculares e outros como SNP e SSR cloroplastidiais (Ebert & Peakall, 2009) a fim de estudar mais refinadamente as interações entre as populações e investigar possíveis rotas de invasão ocorridas anteriormente. Por fim, estudos envolvendo maior número de populações de outros locais e de outras épocas (e.g. coletas antigas) devem ser realizados para determinar variações genéticas nestas populações através do tempo (Cao *et al.*, 2006), comparando-as com cultivares não mais utilizadas.

4.3 Adaptação de cultivares de arroz resistentes às imidazolinonas

O primeiro experimento indicou haver resposta diferencial da germinação das cultivares. As sementes não germinaram sob temperatura de 15°C, entretanto, sob 30°C a germinação foi excessivamente intensa para todas as cultivares o que impede uma avaliação acurada do padrão de germinação (Figura 21). Diversos trabalhos mostraram que as alterações no padrão de germinação de sementes resistentes aos inibidores de ALS são mais evidentes em temperaturas amenas (Dyer *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2004). Corroborando com estes resultados, a faixa de temperatura considerada ideal foi entre 20 e 25°C (Figura 21). Dessa forma, as sementes de todos os lotes das cultivares avaliadas no presente estudo foram germinadas nestas temperaturas.

No segundo experimento, a análise de variância mostrou que o efeito ambiental, caracterizado pelos lotes, não foi significativo ($\alpha=0,05$) em quaisquer avaliações nas duas temperaturas utilizadas no ensaio (Apêndice 6). A análise de variância em modelo misto com o efeito de lote sendo aleatório foi realizada com o intuito de evitar comparações entre os lotes e sim, fazê-los serem computados como amostra de um grupo maior de lotes. Isto amplia a cobertura do experimento, permitindo que sejam feitas inferências mais amplas. Assim, a não significância do efeito de lote na germinação do arroz indica que os resultados observados são referentes às cultivares e não ao efeito ambiental que atuou sobre cada lote em seus respectivos locais de produção.

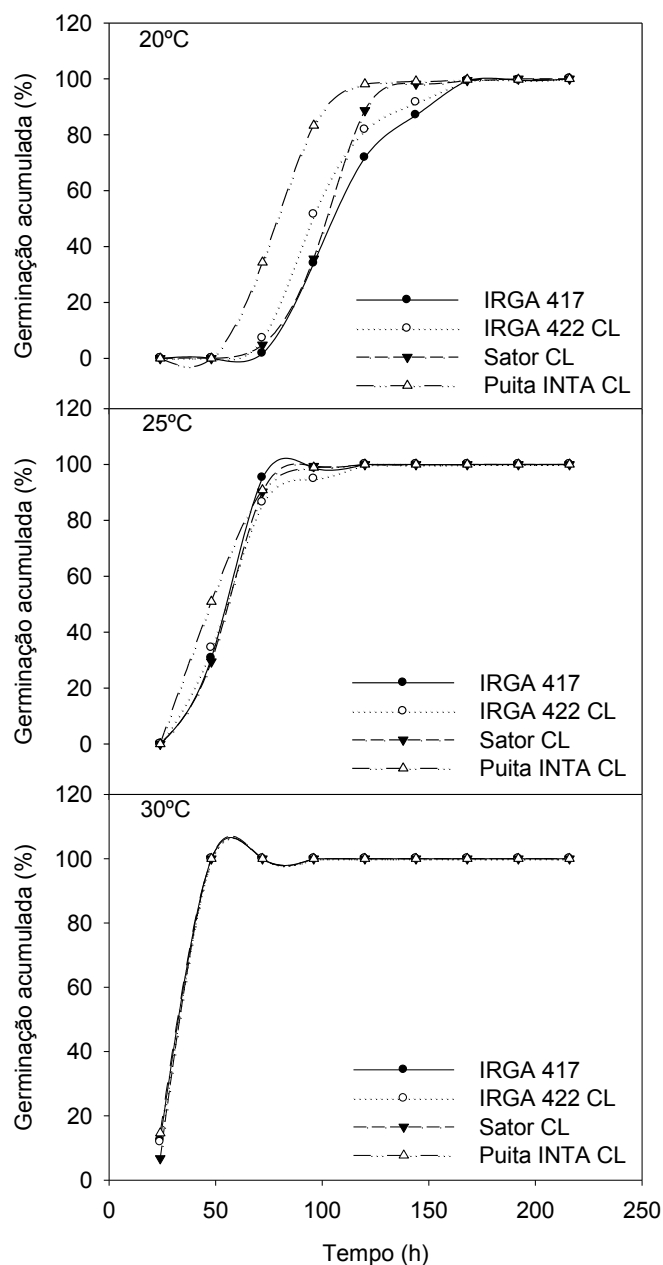


FIGURA 21. Germinação acumulada de quatro cultivares de arroz em função do tempo em três temperaturas. Porto Alegre, RS. 2010.

Os parâmetros b_0 (taxa de germinação na inflexão da curva, TGI) e b_1 (tempo necessário para germinação acumulada alcançar 50%, G50) da equação logística avaliados na germinação em função do tempo descreveram adequadamente o processo germinativo das cultivares de arroz (Figura 21). Além destes, foram estimados os parâmetros *lag phase* (LAG) e taxa de germinação em b_1 (TG). Estes parâmetros têm sido utilizados em diversos estudos com o intuito de comparar a germinação acumulada

de distintas espécies em função do tempo (Guimarães *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004; Royo-Esnal *et al.*, 2010). Entretanto, existem diversas regressões não lineares assintóticas que estimam todos ou alguns destes parâmetros como as funções de Weibull e logística (Brown & Mayer, 1988). O modelo de Weibull popularizou-se em análise de germinação após a publicação do trabalho de Dumur *et al.* (1990). Por outro lado, o modelo logístico considerado um modelo tradicional segundo Brown & Mayer (1988) e é frequentemente utilizado em pesquisas sobre crescimento biológico (Dantigny *et al.*, 2007; Kuk *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2009; Roso *et al.*, 2010b).

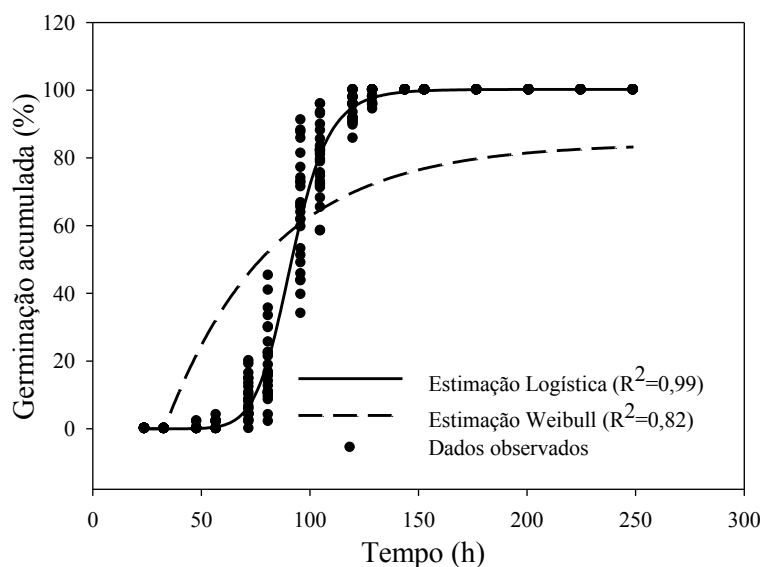


FIGURA 22. Germinação acumulada em função do tempo de cinco lotes de Sator CL a 20°C. Os círculos representam os dados observados, a linha contínua representa a variação estimada pela regressão logística e a linha tracejada representa a variação estimada pela regressão de Weibull. Porto Alegre, RS. 2010.

A variação do crescimento biológico, a qual inclui-se a germinação, em função do tempo possui características definidas que são um estado de latência inicial seguido de rápido crescimento exponencial até atingir um platô estável (Regazzi, 2003). Os dados obtidos neste experimento seguiram estas características e foram satisfatoriamente descritos pelo modelo logístico (Figura 22). Entretanto, o modelo de

Weibull falhou em convergir os dados, ou seja, não descreveu adequadamente a germinação acumulada de arroz em função do tempo. A Figura 22 ilustra os dados observado para a cultivar Sator CL na temperatura de 20°C e as curvas estimadas pelos modelos de Weibull e Logístico (Brown & Mayer, 1988). Nota-se que coeficientes de determinação (R^2) foram altos em ambas as regressões (Figura 22).

Diversos autores apontam que o R^2 não deveria ser utilizado como parâmetro da qualidade de ajuste de um modelo especialmente em regressões não lineares (Kvalseth, 1985; Ratkowsky, 1990; Regazzi, 2003; Onofri *et al.*, 2010; Regazzi & Silva, 2010). A utilização sistemática deste parâmetro em regressões não lineares é devida à sua importância em regressões lineares (Regazzi, 2003). Em regressões lineares o R^2 representa a proporção da variação explicada pelo modelo e neste caso, o coeficiente de correlação entre valores observados e preditos é exatamente o R^2 (Regazzi & Silva, 2010). Entretanto, isto procede somente se o modelo contém o termo constante α , conhecido também como intercepto (Onofri *et al.*, 2010). Por exemplo, a Equação 6 representa um modelo de regressão linear com o termo constante.

EQUAÇÃO 6.
$$Y_i = \alpha + \beta X_i$$

Onde, Y_i é a variável dependente, o α é o termo constante ou intercepto, o β é a constante de declividade da reta e, X_i é a variável independente. Em modelos de regressões não lineares o intercepto α é inexistente. Neste caso, R^2 calculado pelos programas estatísticos não representa a proporção da variação explicada, como em regressões lineares (Onofri *et al.*, 2010). Dessa forma, o uso deste parâmetro para definir se um modelo ajustou-se bem aos dados observados não tem significado estatístico (Onofri *et al.*, 2010; Regazzi & Silva, 2010), por isso não necessita ser calculado (Ratkowsky, 1990). Na tentativa de contornar este problema, diversas expressões foram propostas para estimar R^2 em regressões não lineares

(Kvalseth, 1985). Entretanto, é possível obter altos valores de R^2 mesmo havendo clara discrepância entre os dados observados e preditos ou intervalos de confiança exageradamente amplos (Scott & Wild, 1991; Onofri *et al.*, 2010; Regazzi & Silva, 2010), a exemplo do que foi ilustrado na Figura 22.

Enfim, Regazzi & Silva (2010) sugerem que caso seja desejado calcular o R^2 para regressões não lineares deve-se utilizar a Equação 7 mostrada abaixo.

EQUAÇÃO 7.
$$R^2 = 1 - \frac{SQR}{SQTotal_c}$$

Onde SQR é a soma de quadrados do resíduo e $SQTotal_c$ é a soma de quadrados total corrigida pela média. Porém, a interpretação também não é equivalente àquela das regressões lineares, devendo ser considerada como uma estatística descritiva (Onofri *et al.*, 2010; Regazzi & Silva, 2010). Esta expressão foi utilizada para o cálculo do R^2 para regressão de Weibull e logística nos dados da cultivar Sator CL (Figura 22). Como não existe uma estatística com a importância do R^2 para regressões não lineares outras técnicas de diagnóstico necessitam ser utilizadas. Por exemplo, a comparação da soma de quadrados do erro (SQE) entre regressões para um mesmo conjunto de dados (Regazzi & Silva, 2010). Para o conjunto de dados apresentados na Figura 20, a SQE obtida pela equação de Weibull foi de 342 808 e para a equação logística foi de 12 060. Isto indica que a equação logística se ajustou melhor ao conjunto de dados. Existem ainda outras técnicas como teste F para *lack-of-fit* (Vonesh *et al.*, 1996) que podem ser utilizadas. Diversos pesquisadores apontam que podem ser feitas considerações sobre a ocorrência de discrepância entre valores observados e esperados e a verificação de significado biológico da curva baseados no bom senso do pesquisador (Onofri *et al.*, 2010; Regazzi & Silva, 2010).

A partir da discussão apresentada acima se optou por utilizar o modelo logístico de dois parâmetros, b_0 e b_1 . A comparação destes parâmetros entre os tratamentos foi

realizada com base nos intervalos de confiança a 95% (Onofri *et al.*, 2010). Além destes parâmetros, foi calculado o *lag phase* (LAG) para cada tratamento definido quando a germinação acumulada tornou-se diferente de zero estatisticamente pelo intervalo de confiança a 95%.

O processo de germinação é dividido em três fases que se iniciam com a absorção de água pela semente e vai até a completa exsurgência da radícula, podendo ser dividido em três fases (Bewley, 1997). Na fase I ou embebição, ocorre absorção de água pela semente e a síntese de proteínas a partir de mRNAs conservados. A fase II ou ativação do metabolismo consiste na produção e ativação de enzimas como α -amilase e do fitormônio giberelina, ainda nesta fase inicia a duplicação do DNA e a síntese de proteínas a partir de novos mRNAs. Já a fase III ou alongamento da radícula consiste na mobilização das reservas e no alongamento e divisão das células da radícula. As fases I e II não são perceptíveis a olho nu no caso de sementes de arroz devido à presença de lema e palea rígidos, que impedem a expansão física das células pela entrada de água. No início da fase III, ocorre o rompimento da cariópse pela radícula em expansão. Neste experimento, as sementes foram consideradas germinadas quando, na fase III, as radículas alcançaram 1 mm de comprimento.

O período compreendido pelas fases I e II, também conhecido como *lag phase* (LAG), foi estimado para cada cultivar utilizada no experimento. Observou-se que na temperatura de 20°C o LAG foi de 33h para a cultivar PUITÁ INTA CL, 48h para a IRGA 422 CL e de 57h para Sator CL e IRGA 417 (Tabela 25). Assim sendo, a cultivar resistente PUITÁ INTA CL saiu do LAG 24h antes da cultivar suscetível IRGA 417. Ainda, a cultivar IRGA 422 CL saiu do LAG 9h antes da cultivar suscetível. Entretanto, a cultivar Sator CL teve um LAG semelhante ao da IRGA 417.

TABELA 25. Duração do *lag phase* em sementes de cultivares arroz estimado pela germinação acumulada quando esta se torna diferente de zero. Porto Alegre, RS. 2010.

Temperatura	Cultivar	Germinação (%) [IC 95%]		<i>Lag phase</i> (h) ¹
20°C	PUITÁ INTA CL	0,260	[0,027; 0,492]	33
	IRGA 422 CL	0,972	[0,255; 1,688]	48
	Sator CL	1,000	[0,497; 1,502]	57
	IRGA 417	0,996	[0,436; 1,555]	57
25°C	Sator CL	2,996	[1,325; 4,666]	24
	PUITÁ INTA CL	0,280	[0,058; 0,501]	24
	IRGA 422 CL	0,372	[0,022; 0,721]	33
	IRGA 417	0,172	[0,003; 0,340]	33

¹Período de tempo compreendido pelas fases I e II da germinação.

Trabalhos anteriores mostraram que mutações na enzima ALS de algumas espécies vegetais provocaram diminuição da autorregulação da enzima pelos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, que são os produtos finais da rota metabólica iniciada pela ALS (Boutsalis *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010). Isto faz com que a enzima catalise as reações incessantemente, mesmo quando o requerimento celular dos produtos finais da rota está suprido. Assim, os três aminoácidos são produzidos em excesso e acabam acumulando nas sementes produzidas pelas plantas mutantes favorecendo o processo germinativo em temperaturas amenas. Na espécie *Kochia scoparia*, Dyer *et al.* (1993) detectaram maiores teores de valina, leucina e isoleucina em sementes de biótipos resistentes a herbicidas inibidores de ALS em comparação com biótipos suscetíveis. Em pesquisas realizadas por Eberlein *et al.* (1997; 1999) foram encontrados teores maiores desses aminoácidos em folhas e sementes de *Lactuca serriola*. Entretanto, para *Oryza sativa* informações como estas são escassas. Em um recente trabalho, Bortolotto *et al.* (2008) encontraram maior teor de proteína total em sementes de IRGA 422 CL em comparação com IRGA 417 na média de três lotes por cultivar. O método de quantificação utilizado foi o de Kjeldahl onde se estima o teor de proteína bruta a partir do teor de N encontrado. Desta forma, tanto aminoácidos livres como componentes de proteínas são quantificados. Este resultado é

uma evidência de que a cultivar IRGA 422 CL tenha maior teor de aminoácidos devido à sua mutação no gene da ALS. Como nas fases I e II da germinação a síntese de proteínas é altamente requerida, sementes com teor maior de aminoácidos poderiam passar por estas fases em menor tempo.

A cultivar PUITÁ INTA CL possui a mutação Ala₁₂₂Thr e a IRGA 422 CL tem a mutação Gly₆₅₄Glu (Roso *et al.*, 2010a). Estas mutações provavelmente alteram a autorregulação da ALS pelos aminoácidos, e estes podem acumular nas sementes. A mutação Ala₁₂₂Thr confere um nível de resistência mais elevado às imidazolinonas que as mutações Gly₆₅₄Glu e Ser₆₅₃Asp (Li *et al.*, 2008; Roso *et al.*, 2010b). Isso pode estar relacionado com a autorregulação da ALS que interage com os aminoácidos através de interações de Van der Waals, por ligações de hidrogênio ou ambos, tal como os herbicidas inibidores de ALS (Duggleby *et al.*, 2008). Entretanto, esta alteração na autorregulação é dependente da mutação presente na enzima ALS. As mutações Pro₁₉₇His, Trp₅₇₄Leu e Asn₃₇₆Glu diminuíram a autorregulação da enzima ALS em *Lactuca serriola* (Eberlein *et al.*, 1997), *L. rigidum* (Yu *et al.*, 2010) e *Amaranthus powellii* (Ashigh *et al.*, 2009), respectivamente. Entretanto, a mutação Trp₅₅₇Leu em *Brassica napus* (Hattori *et al.*, 1995) e Pro₁₉₇Gly em *Lolium rigidum* (Yu *et al.*, 2010) não causaram o mesmo efeito. Isto pode explicar o fato de a cultivar Sator CL na temperatura de 20°C não apresentar LAG menor que a cultivar suscetível IRGA 417, pois provavelmente a mutação Ser₆₅₃Asp presente em Sator CL não afeta a autorregulação da ALS. Estudos de avaliação da atividade da enzima ALS na presença dos aminoácidos e a quantificação destes aminoácidos em sementes são necessários para a confirmação desta hipótese.

Sob a temperatura de 25°C o LAG foi de 24h para as cultivares Sator CL e PUITÁ INTA CL e de 33h para IRGA 422 CL e IRGA 417 (Tabela 25). A cultivar

Sator CL teve um LAG relativamente curto se comparado ao observado em 20°C (Tabela 25). A diminuição do LAG na cultivar Sator foi mais intenso que nas demais cultivares, o que pode ser explicado pelo fato desta a cultivar ser um híbrido e possuir alta heterose. O vigor híbrido das sementes da cultivar Sator CL se manifestou principalmente na temperatura de 25°C em relação ao LAG. Nesta temperatura a cultivar PUITÁ INTA CL saiu do LAG 9h antes da IRGA 417 enquanto que IRGA 422 CL teve LAG igual ao da cultivar suscetível. Assim, a hipótese de que cultivares de arroz resistentes à imidazolinonas germinam antes que as suscetíveis em temperaturas amenas foi comprovada. Estes resultados corroboram com os encontrados por Park *et al.* (2004) onde biótipos de *Bromus tectorum* resistentes à herbicidas inibidores de ALS tiveram menores LAG quando comparados à biótipos resistentes nas temperaturas de 5, 15 e 25°C.

Além do *lag phase*, a taxa de germinação também está relacionada com o efeito do acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada em genótipos resistentes à imidazolinonas. Assim, a análise de regressão foi realizada para descrever a variação da germinação acumulada durante o período total de duração do experimento que foi de 249h. Os parâmetros b_0 (taxa de germinação na inflexão da curva, TGI), b_1 (tempo necessário para germinação acumulada alcançar 50%, G50) e taxa de germinação no ponto b_1 (TG) foram estimados para cada lote avaliado e para cada cultivar na média dos lotes. Os parâmetros b_0 e b_1 variaram entre lotes dentro de cada cultivar nas temperaturas de 20 e 25°C (Tabelas 26 e 27). A hipótese de que sementes de cultivares resistentes aos inibidores de ALS germinam mais rápido que as de cultivares suscetíveis se confirmou, havendo entretanto, variações entre lotes da mesma cultivar. O efeito de lote não foi significativo na análise de variância, porém os parâmetros do modelo logístico, através do intervalo de confiança a 95%, diferiram entre si (Tabelas 26 e 27).

Isso se deve ao fato dos efeitos de lotes estarem independentes das cultivares na análise de variância e agrupados às cultivares na análise de regressão não linear. A análise de regressão não linear por lote foi realizada com intuito de visualizar o padrão de germinação individual de cada lote e salientar os efeitos ambientais observados.

TABELA 26. Parâmetros e intervalo de confiança da germinação acumulada à 20°C de sementes de lotes de cultivares de arroz, obtidos pelo ajuste do modelo logístico e taxa de germinação em b_l . Porto Alegre, RS. 2010.

Cultivar - Lote	b_0 - TGI (%.h ⁻¹) [IC 95%] ¹	b_l - G50 (h) [IC 95%] ¹	TG (%.h ⁻¹) [IC 95 %]
IRGA 417 - 1	0,052 [0,048; 0,055]	114,8 [113,3; 116,2]	1,31 [1,70; 2,13]
IRGA 417 - 2	0,056 [0,049; 0,061]	108,4 [106,4; 110,5]	1,39 [1,84; 2,37]
IRGA 417 - 3	0,063 [0,057; 0,068]	98,1 [96,4; 99,6]	1,57 [1,95; 2,42]
IRGA 417 - 4	0,053 [0,049; 0,057]	123,8 [122,2; 125,4]	1,34 [2,06; 2,65]
IRGA 417 - 5	0,075 [0,064; 0,084]	95,1 [93,0; 97,1]	1,87 [3,75; 5,45]
IRGA 422 CL - 1	0,074 [0,064; 0,084]	75,3 [73,3; 77,2]	1,86 [2,41; 2,92]
IRGA 422 CL - 2	0,050 [0,044; 0,055]	109,9 [107,4; 112,4]	1,24 [2,81; 3,35]
IRGA 422 CL - 3	0,059 [0,052; 0,065]	95,3 [93,1; 97,3]	1,47 [2,72; 3,47]
IRGA 422 CL - 4	0,070 [0,062; 0,078]	109,7 [107,9; 111,5]	1,76 [2,95; 3,57]
IRGA 422 CL - 5	0,049 [0,043; 0,054]	117,8 [115,4; 120,2]	1,22 [3,03; 3,73]
PUITÁ INTA CL - 1	0,077 [0,068; 0,085]	74,0 [72,3; 75,6]	1,92 [1,21; 1,39]
PUITÁ INTA CL - 2	0,084 [0,073; 0,094]	85,2 [83,4; 86,8]	2,11 [1,24; 1,53]
PUITÁ INTA CL - 3	0,088 [0,078; 0,097]	90,5 [89,0; 91,9]	2,19 [1,43; 1,70]
PUITÁ INTA CL - 4	0,094 [0,082; 0,106]	87,8 [86,2; 89,4]	2,36 [1,23; 1,44]
PUITÁ INTA CL - 5	0,184 [0,150; 0,218]	78,0 [77,0; 78,9]	4,60 [1,62; 2,12]
Sator CL - 1	0,107 [0,096; 0,117]	98,1 [97,1; 99,0]	2,67 [1,62; 2,10]
Sator CL - 2	0,123 [0,112; 0,134]	86,2 [85,2; 87,0]	3,08 [1,10; 1,38]
Sator CL - 3	0,124 [0,108; 0,138]	90,8 [89,5; 92,0]	3,10 [1,31; 1,63]
Sator CL - 4	0,131 [0,118; 0,143]	92,9 [92,0; 93,7]	3,26 [1,56; 1,95]
Sator CL - 5	0,135 [0,121; 0,149]	93,3 [92,3; 94,1]	3,39 [1,09; 1,35]

¹ b_0 - TGI, taxa de germinação na inflexão; b_l - G50, tempo para germinação alcançar 50%; TG, taxa de germinação em b_l .

TABELA 27. Parâmetros e intervalo de confiança da germinação acumulada à 25°C de sementes de lotes de cultivares de arroz, obtidos pelo ajuste do modelo logístico e taxa de germinação em b_l . Porto Alegre, RS. 2010.

Cultivar - Lote	b_0 - TGI (%.h ⁻¹)	b_l - G50 (h)	TG (%.h ⁻¹)
-----------------	----------------------------------	-----------------	-------------------------

	[IC 95%] ¹		[IC 95%] ¹		[IC 95 %]	
IRGA 417 - 1	0,055	[0,050; 0,060]	89,3	[87,2; 91,2]	1,39	[2,24; 2,77]
IRGA 417 - 2	0,093	[0,084; 0,102]	85,8	[84,6; 87,0]	2,33	[2,03; 2,54]
IRGA 417 - 3	0,103	[0,087; 0,119]	67,9	[66,0; 69,6]	2,58	[2,13; 2,62]
IRGA 417 - 4	0,074	[0,066; 0,081]	78,2	[76,7; 79,7]	1,85	[3,32; 4,43]
IRGA 417 - 5	0,136	[0,116; 0,156]	57,8	[56,6; 58,9]	3,41	[4,97; 6,34]
IRGA 422 CL - 1	0,113	[0,096; 0,130]	59,6	[58,0; 61,1]	2,83	[3,60; 4,41]
IRGA 422 CL - 2	0,072	[0,063; 0,080]	87,8	[86,0; 89,6]	1,80	[4,31; 5,00]
IRGA 422 CL - 3	0,080	[0,070; 0,089]	72,7	[70,9; 74,4]	2,00	[4,67; 5,44]
IRGA 422 CL - 4	0,109	[0,096; 0,121]	62,7	[61,4; 63,9]	2,73	[5,21; 5,92]
IRGA 422 CL - 5	0,089	[0,080; 0,098]	72,0	[70,7; 73,2]	2,23	[5,09; 5,77]
PUITÁ INTA CL - 1	0,100	[0,089; 0,111]	65,9	[64,6; 67,1]	2,51	[1,25; 1,52]
PUITÁ INTA CL - 2	0,092	[0,081; 0,101]	71,8	[70,4; 73,1]	2,29	[2,10; 2,55]
PUITÁ INTA CL - 3	0,095	[0,085; 0,104]	69,6	[68,4; 70,8]	2,38	[2,18; 2,98]
PUITÁ INTA CL - 4	0,155	[0,133; 0,177]	55,9	[54,9; 56,7]	3,88	[1,66; 2,03]
PUITÁ INTA CL - 5	0,226	[0,199; 0,253]	51,7	[51,1; 52,2]	5,66	[2,92; 3,90]
Sator CL - 1	0,160	[0,144; 0,176]	47,6	[46,9; 48,2]	4,01	[2,40; 3,25]
Sator CL - 2	0,186	[0,172; 0,200]	41,7	[41,0; 42,2]	4,66	[1,59; 2,00]
Sator CL - 3	0,202	[0,187; 0,217]	41,0	[40,4; 41,6]	5,06	[1,75; 2,24]
Sator CL - 4	0,223	[0,208; 0,236]	37,3	[36,9; 37,6]	5,57	[2,42; 3,04]
Sator CL - 5	0,217	[0,203; 0,230]	35,5	[35,2; 35,8]	5,43	[2,01; 2,45]

¹ b_0 - TGI, taxa de germinação na inflexão; b_1 - G50, tempo para germinação alcançar 50%; TG, taxa de germinação em b_1 .

Sob a temperatura de 20°C os lotes que obtiveram maiores taxas de germinação na inflexão da curva (parâmetro b_0 ; TGI) foram PUITÁ INTA CL-5, Sator CL-5 e Sator CL-4. Já os lotes com menores TGI foram IRGA 422 CL-5, IRGA 422 CL-2 e IRGA 417-1 (Tabela 26). Ainda nesta temperatura, lotes que apresentaram menor G50 foram PUITÁ INTA CL-1, IRGA 422 CL-1 e PUITÁ INTA CL-5. Os maiores valores de G50 foram encontrados em IRGA 417-4, IRGA 422 CL-5 e IRGA 417-1 (Tabela 26). Em relação à TG, os lotes PUITÁ INTA CL-5; Sator CL-5 e Sator CL-4 obtiveram os maiores valores enquanto que os lotes IRGA 417-4, IRGA 417-1 e IRGA 422-2 apresentaram as menores taxas em b_1 (Tabela 26). Notavelmente, o lote IRGA 417-3 teve um G50 de 95h que foi igual ao observado em IRGA 422 CL-3 e inferior a Sator CL-1. Ainda, IRGA 422 CL-5 teve G50 no valor de 117h que foi superior a alguns lotes de IRGA 417 (Tabela 26). O lote PUITÁ INTA CL-5 teve uma TG superior aos lotes de Sator CL, os quais eram esperados terem mais rápida germinação devido ao fato de Sator CL ser uma cultivar híbrida e, dessa forma, o efeito do vigor

híbrido ou heterose seria responsável, em parte, pelo seu desempenho superior em relação à germinação.

Sob a temperatura de 25°C, os lotes PUITÁ INTA CL-5, Sator CL-4 e Sator CL-5 tiveram os maiores TGI. Por outro lado, os lotes IRGA 417-1, IRGA 422 CL-2 e IRGA 417-4 foram os que apresentaram menores TGI (Tabela 27). A G50 foi mais longa nos lotes IRGA 417-1, IRGA 422 CL-2 e IRGA 417-2. Inversamente, os lotes Sator CL-5, Sator CL-4 e Sator CL-3 alcançaram 50% da germinação mais rapidamente (Tabela 27). A TG sob 25°C foi superior nos lotes de Sator CL, tendo os lotes 4 e 5 as maiores taxas. Ainda, a TG do lote PUITÁ INTA CL-5 foi igual às dos lotes de Sator CL 4 e 5 (Tabela 27).

As condições onde as sementes são produzidas podem causar variações na composição das plantas devido a diferenças ambientais que favorecem certas características em detrimento de outras (Paris *et al.*, 2008). A germinação de sementes de lotes ou biótipos distintos é um exemplo destas características. Por isso, em estudos de alterações de adaptação de plantas, a utilização de lotes ou biótipos distintos é recomendada a fim de isolar o efeito ambiental (Vila-Aiub *et al.*, 2009b). Em trabalho realizado com *Kochia scoparia* resistentes aos herbicidas inibidores de ALS, onde foram testados apenas um biótipo resistente e outro suscetível, não foram encontradas alterações adaptativas (Christoffoleti *et al.*, 1997). Entretanto, outro estudo com esta mesma espécie, onde vários biótipos resistentes e suscetíveis foram testados, foi possível determinar alterações na adaptação dos biótipos resistentes (Dyer *et al.*, 1993).

Sob a temperatura de 20°C as cultivares IRGA 417 e IRGA 422 CL apresentaram TGI similar, enquanto que PUITÁ INTA CL teve TGI superior a estas cultivares e inferior à Sator CL que obteve o maior TGI (Tabela 28). A G50, por outro lado, teve as quatro cultivares diferindo entre si. A Sator CL teve a menor G50,

enquanto que a IRGA 417 teve a menor. A IRGA 422 CL foi maior que a IRGA 417. Porém, a TG de IRGA 417 e IRGA 422 CL foram iguais, enquanto que a de Sator CL apresentou a maior TG, seguido de PUITÁ INTA CL (Tabela 28).

TABELA 28. Parâmetros e intervalo de confiança da germinação acumulada de sementes de cultivares de arroz, obtidos pelo ajuste do modelo logístico e taxa de germinação em b_1 em duas temperaturas. Porto Alegre, RS. 2010.

Temperatura	Cultivar	b_0 - TGI (% \cdot h $^{-1}$) [IC 95%] ¹	b_1 - G50 (h) [IC 95%] ¹	TG (% \cdot h $^{-1}$) [IC 95 %]
20°C	IRGA 417	0,054 [0,050; 0,057]	107,8 [106,4; 109,1]	1,35 [1,26; 1,44]
	IRGA 422 CL	0,050 [0,046; 0,054]	101,7 [99,8; 103,6]	1,26 [1,15; 1,36]
	PUITÁ INTA CL	0,086 [0,080; 0,092]	83,5 [82,6; 84,4]	2,15 [2,00; 2,30]
	Sator CL	0,119 [0,111; 0,125]	92,2 [91,6; 92,7]	2,97 [2,79; 3,14]
25°C	IRGA 417	0,074 [0,066; 0,080]	75,4 [73,9; 76,7]	1,84 [1,67; 2,01]
	IRGA 422 CL	0,079 [0,072; 0,085]	70,7 [69,5; 71,9]	1,98 [1,81; 2,14]
	PUITÁ INTA CL	0,096 [0,088; 0,104]	62,7 [61,7; 63,7]	2,40 [2,20; 2,60]
	Sator CL	0,178 [0,167; 0,188]	40,7 [40,1; 41,1]	4,45 [4,18; 4,71]

¹ b_0 - TGI, taxa de germinação na inflexão; b_1 - G50, tempo para germinação alcançar 50%; TG, taxa de germinação em b_1 .

As cultivares avaliadas tiveram variação semelhante quando sob a temperatura de 25°C. A cultivar Sator CL teve o maior TGI, enquanto a PUITÁ INTA CL apresentou TGI intermediária entre Sator CL e as outras duas cultivares, IRGA 422 CL e IRGA 417 cujas TGI foram não diferiram entre si (Tabela 28). O G50 das cultivares na temperatura de 25°C foi menor que na temperatura de 20°C. A comparação do G50 entre as cultivares foi semelhante ao observado na temperatura menor, com Sator CL tendo o menor valor seguido de PUITÁ INTA CL, IRGA 422 CL e IRGA 417 (Tabela 28). A TG aumentou para todas as cultivares na temperatura de 25°C sendo o aumento observado em Sator CL mais expressivo. Nesta cultivar, a TG em 20°C foi de 2,97 e em 25°C foi de 4,45 (Tabela 28). A TG de Sator foi superior à observada em PUITÁ INTA CL que, por sua vez, teve TG maior que as encontradas em IRGA 422 CL e IRGA 417. Estas duas últimas cultivares tiveram TG iguais, assim como observado na temperatura de 20°C (Tabela 28).

A velocidade de germinação é relacionada com a temperatura devido aos processos metabólicos que são dependentes de energia. Por isso, espera-se que a velocidade de germinação aumente na medida em que aumente a temperatura. As diferenças esperadas entre as cultivares em relação a estes parâmetros deveriam ser mais evidentes na temperatura de 20°C, pois o efeito da própria temperatura sobre a germinação não seria confundido com o efeito das mutações na enzima ALS e possíveis acúmulos de aminoácidos nas sementes. A comparação da cultivar PUITÁ INTA CL com Sator CL ilustra este processo. Na temperatura de 20°C o G50 da PUITÁ INTA CL foi de 83,5h enquanto que da Sator CL foi de 92,2h (Tabela 28). Entretanto, na temperatura de 25°C o G50 de Sator CL foi inferior ao de PUITÁ INTA CL. Isto é devido à heterose presente na cultivar híbrida Sator CL e este padrão aconteceu nos demais parâmetros avaliados, exceto TG onde Sator CL teve nas duas temperaturas maiores valores (Tabela 28).

A cultivar suscetível IRGA 417 apresentou os menores valores nos parâmetros da regressão de forma geral em comparação com as cultivares resistentes testadas. Isto pode ocorrer devido à ausência de mutação na enzima ALS que neste caso, seria autorregulada normalmente pelos aminoácidos de cadeia ramificada. Assim, as sementes de IRGA 417 devem ter teor menor de aminoácidos em comparação com as demais cultivares avaliadas. A fim de averiguar esta hipótese, sugere-se que os teores de aminoácidos em sementes de IRGA 417, IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL sejam avaliados em estudos futuros conforme sugerido anteriormente. As cultivares resistentes IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL têm como ascendente a IRGA 417. A cultivar IRGA 422 CL foi desenvolvida através de retrocruzamentos entre a linhagem resistente 93-AS-3510 e IRGA 417 (IRGA, 2010) enquanto que PUITÁ INTA CL foi obtida de mutações induzidas diretamente de IRGA 417 (Livore *et al.*, 2007). Dessa

forma, as três cultivares possuem composição genética estreita e a resistência à imidazolinonas seria uma diferença evidente entre estas pois o gene da enzima ALS é distinto em ao menos um aminoácido nas três cultivares. Ainda, as mutações induzidas, sobretudo em PUITÁ INTA CL podem gerar substituições, inserções ou mesmo deleções de bases em outros genes. Entretanto, os retrocruzamentos realizados na obtenção das cultivares resistentes têm, entre outras finalidades, a de corrigir ou mitigar estes efeitos indesejados. Provavelmente, os efeitos pleiotrópicos das mutações presentes nas cultivares resistentes também estejam ocorrendo e afetando o padrão de germinação desses genótipos. No caso da cultivar Sator CL estes efeitos ficam confundidos com os efeitos da heterose e se estão presentes, não puderam ser avaliados neste experimento.

Os resultados obtidos são semelhantes a outros encontrados na literatura onde biótipos resistentes tiveram alteração na adaptação confirmada através do padrão de germinação diferencial em relação a biótipos suscetíveis. Avaliando a variação da germinação de biótipos distintos de *L. serriola* resistentes e suscetíveis a inibidores de ALS, Alcocer-Ruthling *et al.* (1992) mostraram que os biótipos resistentes germinaram apresentaram maior taxa de germinação acumulada que os biótipos suscetíveis. Resultados semelhantes foram encontrados por Thompson *et al.* (1994) em biótipos de *K. scoparia*. Os autores observaram haver dependência da temperatura, havendo mais rápida germinação do biótipo resistente quando em baixa temperatura. Nesse sentido, Park *et al.* (2004) mostraram que sementes de biótipos resistentes de *B. tectorum* tiveram taxa de germinação acumulada mais elevada que os biótipos suscetíveis nas temperaturas de 5 a 25°C. Outros trabalhos mostram que outras características, além da germinação, são favorecidas em plantas resistentes a herbicidas. Por exemplo, Wang *et al.* (2010) mostraram que linhagens isogênicas de *Setaria viridis* resistentes aos

herbicidas inibidores de ACCase tiveram maior desenvolvimento vegetativo e maior produção de afilhos em relação àquelas suscetíveis. Neste trabalho, as linhagens resistentes produziram mais sementes mesmo em condições de competição. Investigando a espécie *Euphorbia heterophylla*, Trezzi *et al.* (2009) mostraram que biótipos suscetíveis produziram menores massa seca de folhas+cotilédones, caules+pecíolos e área foliar em comparação com biótipos resistentes aos herbicidas inibidores de ALS e de PROTOX (Protoporfirinogênio oxidase).

Embora no presente estudo tenha sido comprovada alteração positiva na adaptação dos genótipos de arroz resistentes a imidazolinonas em relação ao padrão de germinação, diversos trabalhos têm mostrado penalidades na adaptação de outras espécies resistente a herbicidas. Por exemplo, Vila-Aiub *et al.* (2005b) mostraram que a resistência a herbicidas inibidores de ACCase reduziram a taxa e a germinação de biótipos de *L. rigidum* resistentes quando as sementes foram germinadas de 5 a 20°C. Em outro trabalho, Park & Mallory-Smith (2005) mostraram que *B. tectorum* com resistência múltipla aos herbicidas inibidores de ALS, de ACCase e de Fotossistema II tiveram menor produção de biomassa e de sementes em comparação com biótipos suscetíveis. Ainda, estudando o efeito de diferentes mutações que conferem resistência a herbicidas inibidores de ACCase em *Alopecurus myosuroides*, Menchari *et al.* (2008) mostraram que as mutações Ile₁₇₈₁Leu e Ile₂₀₄₁Asn não causaram alteração na adaptação nas populações, enquanto que a mutação Asp₂₀₇₁Gly causou diminuição da produção de biomassa, na produção e peso de sementes. Salienta-se que neste caso o local de ação do herbicida e a consequente ocorrência de mutações relacionadas à resistência não tem implicações na síntese de aminoácidos e efeito direto na germinação de sementes.

Recentemente, Ashigh *et al.* (2009) investigaram um biótipo de *Solanum ptychanthum* e descobriram que a mutação Ala₂₀₅Val no gene da enzima ALS causou

impacto negativo na adaptação das plantas resistentes, que produziam menos sementes que as suscetíveis em condições em condições ótimas de luminosidade. Linhagens transgênicas de *Oryza sativa* resistentes aos herbicidas inibidores de PROTOX manifestaram penalidades adaptativas em diversas características (Jung *et al.*, 2010). Neste trabalho, o comprimento das panículas, o número de espiguetas por panícula, o peso de mil grãos e conseqüentemente a produção de grãos das linhagens resistentes foram menores em comparação com linhagens silvestres e transgênicas suscetíveis aos inibidores de PROTOX. Os autores destes trabalhos concluíram que na ausência dos herbicidas, os biótipos resistentes não aumentariam em frequência quando em populações mistas com biótipos suscetíveis.

É conhecido o efeito que alterações na adaptação exercem sobre a evolução de populações de plantas e outros organismos (Orr, 2005; Arnold & Martin, 2010). Em situações onde há penalidades adaptativas espera-se que, na ausência do fator de seleção, indivíduos portando alelos restritivos tendam a diminuir ou mesmo desaparecer em populações mistas. Um exemplo clássico de penalidade adaptativa ocorre com biótipos resistentes a herbicidas inibidores de Fotossistema II que apresentam expressiva redução na produção de biomassa e limitada fotossíntese (Jordan, 1999; Nader *et al.*, 2008). A habilidade competitiva destes biótipos é limitada, sobretudo por luz, resultando em desenvolvimento anormal, menor crescimento e menor prolificidade. De forma geral, plantas pequenas são menos capazes de captar recursos se comparadas a plantas grandes. Além disso, uma produção de sementes menor implica em menor progênie nas gerações posteriores e conseqüente diminuição do número de indivíduos com o passar do tempo. Estes fatores atuando simultaneamente em longo prazo, favorecem a substituição dos indivíduos portadores de alelos que conferem resistência aos herbicidas. Entretanto, sucessivas aplicações de herbicidas eliminam indivíduos

suscetíveis e permite que os resistentes sobrevivam e produzam sementes. Nestas condições, a população será predominantemente formada por plantas resistentes, mesmo havendo alteração negativa na adaptação destas. Estes e outros exemplos foram revisados recentemente por Vila-Aiub *et al.* (2009b).

Quando a alteração na adaptação é positiva é esperado aumento da frequência dos indivíduos portando alelos benéficos em populações heterogêneas (Orr, 2010). No caso de resistência a herbicidas conferindo alterações adaptativas positivas, como as citadas anteriormente, os indivíduos resistentes tendem a dominar as populações mistas com plantas suscetíveis, mesmo na ausência dos herbicidas como fatores de seleção (Snow *et al.*, 2010).

No contexto da cultura do arroz, a confirmação da alteração positiva na adaptação das plantas resistentes aos herbicidas inibidores de ALS é importante do ponto de vista de controle da principal planta daninha da cultura, que é o arroz vermelho. O sistema de fecundação predominante no gênero *Oryza* é a autogamia, entretanto, diversos estudos têm mostrado que existe alogamia ou fluxo gênico de aproximadamente 0,1 a 5% (Gealy *et al.*, 2003; Rong *et al.*, 2004; Shivrain *et al.*, 2009a). No entanto, valores extremos de alogamia maiores que 30% têm sido encontrados (Azzini & Rutger, 1982; Langevin *et al.*, 1990). Em espécies de arroz cultivadas a proporção de alogamia é normalmente menor se comparada às espécies silvestres (Gealy *et al.*, 2003). Este padrão é atribuído principalmente a diferenças na estrutura floral entre as espécies, como a presença de estigmas curtos que limitam a recepção de pólen de outros indivíduos em arroz cultivado (Messeguer *et al.*, 2001). Por outro lado, espécies silvestres possuem estigmas longos e abertos, o que favorece a captura de pólen de outras espiguetas (Song *et al.*, 2003).

Embora o arroz vermelho pertença à mesma espécie do arroz cultivado, a proporção de alogamia encontrada é maior que a de arroz cultivado (Shivrain *et al.*, 2009a). Assim, a utilização de cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas por longos períodos favoreceria a transferência do alelo de resistência a estes herbicidas nas populações de arroz vermelho presentes nas áreas de cultivos. De fato, foram encontrados biótipos de arroz vermelho resistentes às imidazolinonas nos EUA após cinco anos de uso das cultivares resistentes (Kuk *et al.*, 2008). No Brasil, Menezes *et al.* (2009) investigaram 228 populações de arroz vermelho do RS e identificaram 128 populações resistentes à imazethapyr+imazapic, o que representa 56% das populações avaliadas. Ainda no caso brasileiro, Roso (2010a) mostrou que as mutações predominantes presentes nos genes da ALS dos mesmos biótipos de arroz vermelho foram iguais aos das cultivares de arroz resistente IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e Sator CL. Enquanto que 13% das populações estudadas apresentaram mutações iguais às presentes nas cultivares PUITÁ INTA CL e Sator CL, mais de 80% apresentaram a mesma mutação que a IRGA 422 CL, que foi a cultivar resistente mais utilizada pelos orizicultores no RS até 2008, cinco anos após a introdução desta cultivar no Brasil.

O fluxo gênico das cultivares resistentes para o arroz vermelho pode não ser a única forma de evolução da resistência nas populações desta planta daninha. A frequência inicial de mutações no gene da ALS conferindo resistência a herbicidas é de aproximadamente 10^{-6} (Preston & Powles, 2002; Gressel, 2009). Além disso, o fato de haver mais de 22 possíveis mutações no gene da ALS que conferem resistência permite que haja rápida evolução de populações resistentes quando estes herbicidas começam a ser utilizados (Delye *et al.*, 2009; Powles & Yu, 2010). De fato, Sales *et al.* (2008) reportaram que a mutação Gly₆₅₄Glu, presente na cultivar CL 121, ocorreu naturalmente

em uma população de arroz vermelho do Arkansas. Ainda, os autores reportaram, pela primeira vez, a mutação Val₆₆₉Met conferindo resistência à imidazolinonas em uma população de arroz vermelho. Assim, biótipos de arroz vermelho que possuem mutações que, além da resistência aos herbicidas inibidores da ALS, causem variação positiva na adaptação poderão predominar nas populações existentes em áreas orizícolas que nunca receberam estes herbicidas. A germinação mais rápida favorecerá a dominação de indivíduos resistentes em detrimento dos suscetíveis e assim, o controle destas populações com herbicidas tornar-se-ia cada vez mais limitado.

Por outro lado, o conhecimento da germinação mais rápida em plantas de arroz resistentes a imidazolinonas pode proporcionar a adequação de alternativas de manejo de arroz vermelho resistente estes herbicidas. Neste caso, os indivíduos resultantes de germinação mais rápida podem ser eliminados com maior eficiência através da adoção de práticas de controle realizadas em períodos antecedentes ao estabelecimento do arroz cultivado ou pós-emergência inicial da cultura. Por exemplo, o herbicida glyphosate vem sendo utilizado na dessecação antes da semeadura do arroz nos sistemas plantio convencional, direto e cultivo mínimo. Este herbicida poderia ser utilizado após o início da germinação do arroz vermelho nas áreas infestadas (Foloni *et al.*, 1997). Em sistema convencional e cultivo mínimo, a mobilização do solo favorece a germinação de sementes de arroz vermelho enterradas e dessa forma, mais plântulas são controladas. O glyphosate aplicado quando as plantas estão no estágio S3 de Counce *et al.* (2000), conhecido como ponto-de-agulha, poderia ser uma alternativa, principalmente no sistema plantio direto. Esta técnica consiste em realizar aplicação de glyphosate de forma que somente o coleóptilo destas plântulas seja atingido. Como o coleóptilo não tem comunicação via floema com raízes ou folhas, o herbicida não é translocado para outros órgãos vegetais. Entretanto, esta prática requer elevado conhecimento sobre a

cultivar e os equipamentos a serem utilizados devido ao risco existente de plântulas de arroz serem mortas pela ação do herbicida. Mesmo assim, esta tem sido usada cultivos experimentais de arroz (IRGA, 2010) e por produtores (Matzenbacher, F. O., comunicação pessoal). O trabalho desenvolvido por Crusciol *et al.* (2002) mostrou que o glyphosate aplicado em S3 reduziu 28% o estande inicial de plantas enquanto que a aplicação três dias reduziu 76%, contudo, o estudo não estimou rendimento de grãos de arroz. Em outro trabalho, a redução do estande de plantas de arroz foi de 22% após a aplicação de glyphosate em S3 (Mariot & Menezes, 2009b). Entretanto, o rendimento de grãos da cultivar PUITÁ INTA CL não foi afetado nas condições deste trabalho. Assim, sugere-se que mais pesquisas sejam realizadas com o objetivo de aperfeiçoar o controle de populações resistentes de arroz vermelho, integrando outros métodos de controle em alternativa ou concomitante ao método químico. Outras formas de manejo do arroz vermelho foram discutidas no item 4.2.1.

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que as cultivares resistentes aos herbicidas do grupo das imidazolinonas PUITÁ INTA CL, IRGA 422 CL e Sator CL germinam mais rápido que a cultivar suscetível IRGA 417. Entretanto, a magnitude da diferença entre elas foi dependente da mutação presente na cultivar, no caso de PUITÁ INTA CL e IRGA 422 CL, e do vigor híbrido presente em Sator CL. Populações de arroz vermelho que eventualmente desenvolvam resistência a estes herbicidas, através de fluxo gênico ou seleção independente, poderão adquirir estas características adaptativas.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A origem da resistência aos herbicidas imidazolinonas nos acessos de arroz vermelho estudados é predominantemente relacionada ao fluxo gênico de pólen a partir de cultivares de arroz resistentes a estes herbicidas. Entretanto, também foram detectados processos de seleção de mutações espontâneas no gene da ALS pelo uso continuado de herbicidas imidazolinonas.

As populações de arroz vermelho do RS estudadas apresentaram alta diversidade genética. Essas populações apresentaram alta diferenciação genética, embora esta tenha sido menor em comparação à resultados da literatura. As populações estão estreitamente estruturadas entre si e entre as cultivares de arroz mais utilizadas nos últimos anos. Isto sugere que o fluxo gênico de sementes de arroz vermelho e entre cultivares de arroz e arroz vermelho ocorre em níveis elevados no RS.

O fluxo gênico de pólen entre plantas de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imidazolinonas e plantas de arroz suscetíveis a estes herbicidas ocorre em condições de lavoura em níveis iguais ou maiores que entre plantas cultivadas e arroz vermelho. Isto caracteriza a possibilidade de introgressão dos alelos que conferem a resistência a plantas suscetíveis mesmo na ausência de cultivares resistentes.

As cultivares de arroz resistente aos herbicidas imidazolinonas apresentaram alteração positiva na adaptação, relacionada ao aumento da velocidade de germinação

em temperaturas amenas. Esta variação foi dependente da mutação do gene da ALS presente em cada cultivar de arroz. Isto sugere que indivíduos híbridos oriundos de fluxo gênico entre plantas de arroz vermelho e cultivares resistentes podem germinar mais rapidamente que indivíduos suscetíveis aumentando assim sua capacidade de competição com o arroz cultivado.

Tomados conjuntamente estes resultados indicam que práticas de manejo de arroz vermelho baseadas na diminuição da pressão de seleção causada pelo uso contínuo de herbicidas imidazolinonas e, principalmente, na mitigação do fluxo gênico tanto de sementes como de pólen devem ser estimuladas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, S., *et al.* Rainfall prediction based on the relationship between rainfall and El Nino Southern Oscillation (ENSO). **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**. Colombo, v. 38, n. 4, p. 249-255, 2010.

AGOSTINETTO, D., *et al.* Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. **Ciencia Rural**. Santa Maria, v. 31, n., p. 341-349, 2001.

AL-AHMAD, H., GALILI, S. e GRESSEL, J. Poor competitive fitness of transgenically mitigated tobacco in competition with the wild type in a replacement series. **Planta**. Heidelberg, v. 222, n. 2, p. 372-385, 2005.

AL-AHMAD, H. e GRESSEL, J. Mitigation using a tandem construct containing a selectively unfit gene precludes establishment of *Brassica napus* transgenes in hybrids and backcrosses with weedy *Brassica rapa*. **Plant Biotechnology Journal**. Bristol, v. 4, n. 1, p. 23-33, 2006.

ALCOCER-RUTHLING, M., THILL, D. C. e SHAFII, B. Differential Competitiveness of Sulfonylurea Resistant and Susceptible Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**. Lacombe, v. 6, n. 2, p. 303-309, 1992.

APER, J., *et al.* The origin of herbicide-resistant *Chenopodium album*: analysis of genetic variation and population structure. **Weed Research**. Oxford, v. 50, n. 3, p. 235-244, 2010.

ARNOLD, M. L. e MARTIN, N. H. Hybrid fitness across time and habitats. **Trends in Ecology & Evolution**. London, v. 25, n. 9, p. 530-536, 2010.

ARRIOLA, P. E. e ELLSTRAND, N. C. Fitness of interspecific hybrids in the genus *Sorghum*: Persistence of crop genes in wild populations. **Ecological Applications**, v. 7, n. 2, p. 512-518, 1997.

ASHIGH, J., *et al.* Characterization and diagnostic tests of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors due to an Asp376Glu substitution in *Amaranthus powellii*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 95, n. 1, p. 38-46, 2009.

AVILA, L. A., *et al.* Effect of Flood Timing on Red Rice (*Oryza* spp.) Control with Imazethapyr Applied at Different Dry-Seeded Rice Growth Stages1. **Weed Technology**. Lacombe, v. 19, n. 2, p. 476-480, 2005.

AZZINI, L. E. e RUTGER, J. N. Amount of Outcrossing on Different Male Steriles of Rice1. **Crop Science**. Madison, v. 22, n. 5, p. 905-907, 1982.

BALBINOT JR, A. A., *et al.* Características de plantas de arroz e a habilidade competitiva com plantas daninhas. **Planta Daninha**. Londrina, v. 21, n., p. 165-174, 2003.

BERLATO, M. A. e FONTANA, D. C. **El Niño e La Niña**. Porto Alegre: UFRGS, v. 1, 2003. 110pp.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**. Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.

BOCK, R. Transgenic Plastids in Basic Research and Plant Biotechnology. **Journal of Molecular Biology**. London, v. 312, n. 3, p. 425-438, 2001.

BORBA, T. C. O., *et al.* Microsatellite marker-mediated analysis of the EMBRAPA Rice Core Collection genetic diversity. **Genetica**. New York, v. 137, n. 3, p. 293-304, 2009a.

_____. Genetic variability of Brazilian rice landraces determined by SSR markers. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. Brasília, v. 44, n. 7, p. 706-712, 2009b.

BORTOLOTTO, R. P., *et al.* Teor de proteína e qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Bragantia**. Campinas, v. 67, n., p. 513-520, 2008.

BOTSTEIN, D., *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**. Boston, v. 32, n. 3, p. 314-31, 1980.

BOUTSALIS, P., KAROTAM, J. e POWLES, S. B. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. **Pesticide Science**. Oxford, v. 55, n. 5, p. 507-516, 1999.

BRANDT, E. A., *et al.* Desempenho agrônomico de soja em função da sucessão de culturas em sistema de plantio direto. **Ciencia e Agrotecnologia**. Lavras, v. 30, n., p. 869-874, 2006.

BRONDANI, C., *et al.* Determination of genetic variability of traditional varieties of Brazilian rice using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 29, n., p. 676-684, 2006.

BROWN, R. F. e MAYER, D. G. Representing Cumulative Germination. **Annals of Botany**. London, v. 61, n. 2, p. 127-138, 1988.

BRUNES, T. O., *et al.* Fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado estimado por meio de marcadores de microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 37, n. 2, p., 2007.

BURGOS, N. R., *et al.* Red rice (*Oryza sativa*) status after 5 years of imidazolinone-resistant rice technology in Arkansas. **Weed Technology**. Lacombe, v. 22, n. 1, p. 200-208, 2008.

CAO, M. X., *et al.* Engineering Higher Yield and Herbicide Resistance in Rice by - Mediated Multiple Gene Transformation. **Crop Science**. Madison, v. 44, n. 6, p. 2206-2213, 2004.

CAO, Q., *et al.* Genetic Diversity and Origin of Weedy Rice (*Oryza sativa f. spontanea*) Populations Found in North-eastern China Revealed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. **Annals of Botany**. London, v. 98, n. 6, p. 1241-1252, 2006.

CAO, Q. J., *et al.* Performance of hybrids between weedy rice and insect-resistant transgenic rice under field experiments: Implication for environmental biosafety assessment. **Journal of Integrative Plant Biology**. Beijing, v. 51, n. 12, p. 1138-1148, 2009.

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**. Oxford, v. 13, n. 6, p. 1341-1356, 2004.

CASSOL, G. V. *et al.* Aplicação de imazamox no estágio reprodutivo do arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto, SP, 2010. CD-ROM

CHEN, L. J., *et al.* Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. **Annals of Botany**. London, v. 93, n. 1, p. 67-73, 2004.

CHENG, C., *et al.* Polyphyletic Origin of Cultivated Rice: Based on the Interspersion Pattern of SINEs. **Molecular Biology and Evolution**. Oxford, v. 20, n. 1, p. 67-75, 2003.

CHRISTOFFOLETI, P. J., WESTRA, P. B. e MOORE, F. Growth analysis of sulfonylurea-resistant and -susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**. Champaign, v. 45, n. 5, p. 691-695, 1997.

CHUNG, J. W. e PARK, Y. J. Population structure analysis reveals the maintenance of isolated sub-populations of weedy rice. **Weed Research**. Oxford, v. 50, n. 6, p. 606-620, 2010.

CONAB. Consolidado e acompanhamento da safra de 2006/2007, 5º levantamento. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 29 jul. 2009.

COUNCE, P. A., KEISLING, T. C. e MITCHELL, A. J. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**. Madison, v. 40, n. 2, p. 436-443, 2000.

CROOKS, H. L., *et al.* Vegetative Growth and Competitiveness of Common Cocklebur Resistant and Susceptible to Acetolactate Synthase-inhibiting Herbicides. **The Journal of Cotton Science**. Memphis, v. 9, n. 4, p. 229-237, 2005.

CROUGHAN, T. P. **Herbicide resistant rice**. Board of Supervisors of Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. United States. Patent Number: 5773704. 1998.

CRUSCIOL, C. A. C., *et al.* Aplicação tardia de glyphosate e estande e desenvolvimento inicial do arroz em sistema de cultivo mínimo. **Planta Daninha**, v. 20, n., p. 45-51, 2002.

DANIELL, H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. **Nature Biotechnology**. London, v. 20, n. 6, p. 581-586, 2002.

DANTIGNY, P., *et al.* Mould germination: Data treatment and modelling. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 17-24, 2007.

DELYE, C., *et al.* Variation in the gene encoding acetolactate-synthase in *Lolium* species and proactive detection of mutant, herbicide-resistant alleles. **Weed Research**. Oxford, v. 49, n. 3, p. 326-336, 2009.

DIARRA, A., SMITH, R. J. e TALBERT, R. E. Growth and morphological characteristics of red rice (*Oryza sativa*) biotypes. **Weed Science**. Champaign, v. 33, n. 3, p. 310-314, 1985.

DINIZ-FILHO, J. A. F., *et al.* A review of techniques for spatial modeling in geographical, conservation and landscape genetics. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 32, n., p. 203-211, 2009.

DONG, Y. B., *et al.* Ecological, morphological and genetic diversity in *Oryza rufipogon* Griff. (Poaceae) from Hainan Island, China. **Genetic Resources and Crop Evolution**. New York, v. 57, n. 6, p. 915-926, 2010.

DUGGLEBY, R. G., MCCOURT, J. A. e GUDDAT, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 309-324, 2008.

DUMUR, D., PILBEAM, C. J. e CRAIGON, J. Use of the Weibull Function to Calculate Cardinal Temperatures in Faba Bean. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 41, n. 11, p. 1423-1430, 1990.

DUPUTIE, A., *et al.* Natural hybridization between a clonally propagated crop, cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and a wild relative in French Guiana. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 16, n. 14, p. 3025-3038, 2007.

DYER, W. E., CHEE, P. W. e FAY, P. K. Rapid Germination of Sulfonylurea-Resistant *Kochia scoparia* L. Accessions Is Associated with Elevated Seed Levels of Branched Chain Amino Acids. **Weed Science**. Champaign, v. 41, n. 1, p. 18-22, 1993.

EBERLEIN, C. V., *et al.* Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. **Weed Science**. Champaign, v. 47, n. 4, p. 383-392, 1999.

_____. Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science**. Champaign, v. 45, n. 2, p. 212-217, 1997.

EBERT, D. e PEAKALL, R. O. D. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. **Molecular Ecology Resources**. Malden, v. 9, n. 3, p. 673-690, 2009.

ELEFTHEROHORINOS, I. G. e DHIMA, K. V. Red rice (*Oryza sativa*) Control in Rice (*O. sativa*) with Preemergence and Postemergence Herbicides1. **Weed Technology**. Lacombe, v. 16, n. 3, p. 537-540, 2002.

ELLING, B., *et al.* Hybridisation between oilseed rape (*Brassica napus*) and tetraploid *Brassica rapa* under field conditions. **Flora**. Jena, v. 205, n. 6, p. 411-417, 2010.

ELLSTRAND, N. C. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**. London, v. 358, n. 1434, p. 1163-1170, 2003.

_____. Evolution of invasiveness in plants following hybridization. **Biological Invasions**. Dordrecht, v. 11, n. 5, p. 1089-1091, 2009.

ELLSTRAND, N. C., *et al.* Spontaneous hybridization between maize and teosinte. **Journal of Heredity**. Cary, v. 98, n. 4, p., 2007.

_____. Crops gone wild: evolution of weeds and invasives from domesticated ancestors. **Evolutionary Applications**. Malden, v. 3, n. 5-6, p. 494-504, 2010.

ELLSTRAND, N. C., PRENTICE, H. C. e HANCOCK, J. F. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v. 30, n., p. 539-563, 1999.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa, 1999. 412p.

ENDO, T., *et al.* Estimate of outcrossing rates in a rice plant (*Oryza sativa* L.) under field conditions using a purple grain rice cultivar, Okunomurasaki. **Breeding Science**. Tokyo, v. 59, n. 2, p. 195-202, 2009.

ESTOUP, A. e GUILLEMAUD, T. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? **Molecular Ecology**. Oxford, v. 19, n. 19, p. 4113-4130, 2010.

EVANNO, G., REGNAUT, S. e GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G. e SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**. Auckland, v. 1, n., p. 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E. e QUATTRO, J. M. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics**. Baltimore, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FAO. Global cereal supply and demand brief. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai473e/ai473e04.htm>>. Acesso em: 15 set. 2010.

FERREIRA, F. G., GUMA, J. M. C. R., GORELIK, D. B. Resistência de grãos de arroz vermelho e preto presentes em amostras de sementes sem origem ao herbicida do grupo das imidazolinonas. CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre, 2009. CD-ROM

FALUSH, D., STEPHENS, M. e PRITCHARD, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. **Genetics**. Baltimore, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, 2003.

FINKELSTEIN, R., *et al.* Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology**. Palo Alto, v. 59, n., p. 387-415, 2008.

FLECK, N. G., *et al.* Competitividade relativa entre cultivares de arroz irrigado e biótipo de arroz-vermelho. **Planta Daninha**. Londrina, v. 26, n., p. 101-111, 2008.

FOFANA, I., *et al.* Diversity and genetic structure of teak (*Tectona grandis* L.f) in its natural range using DNA microsatellite markers. **New Forests**. Dordrecht, v. 37, n. 2, p. 175-195, 2009.

FOLONI, L. L., RODRIGUES, J. D. e ONO, E. O. Controle do arroz vermelho através do herbicida sulfosate isolado e em mistura com adjuvantes. **Planta Daninha**. Londrina, v. 15, n., p. 39-45, 1997.

GARRIS, A. J., *et al.* Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**. Baltimore, v. 169, n. 3, p. 1631-1638, 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**. Champaign, v. 57, n. 6, p. 627-643, 2009.

GEALY, D. R., MITTEN, D. H. e RUTGER, J. N. Gene Flow Between Red Rice (*Oryza sativa*) and Herbicide-Resistant Rice (*O. sativa*): Implications for Weed Management. **Weed Technology**. Lacombe, v. 17, n. 3, p. 627-645, 2003.

GEALY, D. R., TAI, T. H. e SNELLER, C. H. Identification of red rice, rice, and hybrid populations using microsatellite markers. **Weed Science**, v. 50, n. 3, p. 333-339, 2002.

GRESSEL, J. Tandem constructs: preventing the rise of superweeds. **Trends in Biotechnology**. London, v. 17, n. 9, p. 361-366, 1999.

_____. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**. Malden, v. 65, n. 11, p. 1164-1173, 2009.

GRESSEL, J. e VALVERDE, B. E. A strategy to provide long-term control of weedy rice while mitigating herbicide resistance transgene flow, and its potential use for other crops with related weeds. **Pest Management Science**. Malden, v. 65, n. 7, p. 723-731, 2009.

GRIFFIN, J. L. e HARGER, T. J. Red Rice (*Oryza sativa*) Control Options in Soybeans (*Glycine max*). **Weed Technology**. Lacombe, v. 4, n. 1, p. 35-38, 1990.

GROSS, B. L., *et al.* Seeing red: the origin of grain pigmentation in US weedy rice. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 19, n. 16, p. 3380-3393, 2010.

GU, X. Y., KIANIAN, S. F. e FOLEY, M. E. Dormancy genes from weedy rice respond divergently to seed development environments. **Genetics**. Baltimore, v. 172, n. 2, p. 1199-1211, 2006.

GU, X. Y., *et al.* Genetic analysis of adaptive syndromes interrelated with seed dormancy in weedy rice (*Oryza sativa*). **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v. 110, n. 6, p. 1108-1118, 2005.

GUIMARÃES, S. C., SOUZA, I. F. e PINHO, E. V. R. V. Efeito de temperaturas sobre a germinação de sementes de erva-de-touro (*Tridax procumbens*). **Planta Daninha**. Londrina, v. 18, n., p. 457-464, 2000.

GUPTA, V., *et al.* Gel versus capillary electrophoresis genotyping for categorizing treatment outcomes in two anti-malarial trials in Uganda. **Malaria Journal**. London, v. 9, n. 1, p. 19, 2010.

HAMID, Z. A. A., MANSOR, M. e MAN, A. Life cycle and morphological characteristics of weedy rice (*Oryza sativa* complex, locally called padi angin), a noxious weed of ricefields in Malaysia. **Jurnal Biosains**. Pulau Pinang, v. 18, n. 1, p. 55-79, 2007.

HARLAN, J. R. **Crops and Man**. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, v., 1975. 295p.

HARTL, D. L. e CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. Sunderland, MA: Sinauer, v. 1, 2007. 565p.

HATTORI, J., *et al.* An acetohydroxy acid synthase mutant reveals a single site involved in multiple herbicide resistance. **Molecular and General Genetics**. Berlin, v. 246, n. 4, p. 419-425, 1995.

HU, T. Z., *et al.* Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase. **Molecular Breeding**. Dordrecht, v. 24, n. 4, p. 409-418, 2009.

HUANGFU, C. H., QIANG, S. e SONG, X. L. Performance of hybrids between transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and wild *Brassica juncea*. An evaluation of potential for transgene escape. **Crop Protection**. Oxford, v. 30, n. 1, p. 57-62, 2011.

HUBISZ, M. J., *et al.* Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**. Malden, v. 9, n. 5, p. 1322-1332, 2009.

HUFFORD, M. B., GEPTS, P. e ROSS-IBARRA, J. Influence of cryptic population structure on observed mating patterns in the wild progenitor of maize (*Zea mays ssp parviglumis*). **Molecular Ecology**. Oxford, v. 20, n. 1, p. 46-55, 2011.

HUGHES, A. R., *et al.* Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**. Malden, v. 11, n. 6, p. 609-623, 2008.

INPI. Indicações Geográficas concedidas. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/indicacao/igs-registradas-no-brasil/indicacoes-geograficas-concedidas/>>. Acesso em: 08 set. 2010.

IRGA. Instituto Rio Grandense do Arroz. **Lavoura Arrozeira**. Porto Alegre, v.58, n. 449, p.5-8, 2009.

_____. Instituto Rio Grandense do Arroz. **Lavoura Arrozeira**. Porto Alegre, v.58, n. 453, p.5-8, 2010.

_____. Instituto Rio Grandense do Arroz. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>>. Acesso em: 15 out. 2010.

JHALA, A. J., *et al.* Pollen-mediated gene flow in flax (*Linum usitatissimum* L.): can genetically engineered and organic flax coexist? **Heredity**. London, v., n., p., 2010.

JONES, N., *et al.* Markers and mapping revisited: finding your gene. **New Phytologist**. Malden, v. 183, n. 4, p. 935-966, 2009.

JORDAN. Fitness effects of the triazine resistance mutation in *Amaranthus hybridus*: relative fitness in maize and soyabean crops. **Weed Research**, v. 39, n. 6, p. 493-505, 1999.

JUN, R., *et al.* Modelling pollen-mediated gene flow in rice: risk assessment and management of transgene escape. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 4, p. 452-464, 2010.

JUNG, H. I., *et al.* Resistance pattern and antioxidant enzyme profiles of protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 91, n. 1, p. 53-65, 2008.

_____. Resistance levels and fitness of protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice in paddy fields. **Field Crops Research**. Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 125-131, 2010.

KADARU, S., *et al.* Development and application of allele-specific PCR assays for imazethapyr resistance in rice (*Oryza sativa*). **Euphytica**. Wageningen, v. 160, n. 3, p. 431-438, 2008.

KANYA, J. I., *et al.* Dispersal distance of rice (*Oryza Sativa* L.) pollen at the Tana River delta in the coast province, Kenya. **African Journal of Biotechnology**. Victoria Island, v. 8, n. 10, p., 2009.

KATO, H. e NAMAI, H. Floral Characteristics and Environmental Factors for Increasing Natural Outcrossing Rate for F1 Hybrid Seed Production of Rice *Oryza sativa* L. **Japanese Journal of Breeding**. Tokyo, v. 37, n. 3, p. 318-330, 1987.

KAVANAGH, V. B., HALL, L. M. e HALL, J. C. Potential Hybridization of Genetically Engineered Triticale with Wild and Weedy Relatives in Canada. **Crop Science**. Madison, v. 50, n. 4, p. 1128-1140, 2010.

KAWASAKI, A., *et al.* Molecular constitution of weedy rice (*Oryza sativa* L.) found in Okayama prefecture, Japan. **Breeding Science**. Tokyo, v. 59, n. 3, p. 229-236, 2009.

KENKEL, N. C., *et al.* Multivariate analysis in weed science research. **Weed Science**. Champaign, v. 50, n. 3, p. 281-292, 2002.

KOORNNEEF, M., BENTSINK, L. e HILHORST, H. Seed dormancy and germination. **Current Opinion in Plant Biology**. London, v. 5, n. 1, p. 33-36, 2002.

KUK, Y. I., BURGOS, N. R. e SHIVRAIN, V. K. Natural tolerance to imazethapyr in red rice (*Oryza sativa*). **Weed Science**. Champaign, v. 56, n. 1, p. 1-11, 2008.

KUMAGAI, M., WANG, L. e UEDA, S. Genetic diversity and evolutionary relationships in genus *Oryza* revealed by using highly variable regions of chloroplast DNA. **Gene**. Amsterdam, v. 462, n. 1-2, p. 44-51, 2010.

KUMAR, V., *et al.* Risks of herbicide-resistant rice in India: A review. **Crop Protection**. Oxford, v. 27, n. 3-5, p. 320-329, 2008.

KURODA, Y., *et al.* Genetic structure of three *Oryza* AA genome species (*O. rufipogon*, *O. nivara* and *O. sativa*) as assessed by SSR analysis on the Vientiane Plain of Laos. **Conservation Genetics**. Dordrecht, v. 8, n., p. 149-158, 2007.

KVALSETH, T. O. Cautionary note about R^2 . **American Statistician**. Alexandria, v. 39, n. 4, p. 279-285, 1985.

LANGE, K. **Applied Probability**. New York: Springer, v. 1, 2003. 368p.

LANGEVIN, S. A., CLAY, K. e GRACE, J. B. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). **Evolution**. Lancaster, v. 44, n. 4, p. 1000-1008, 1990.

LAURENTIN, H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**. New York, v. 56, n. 2, p. 277-292, 2009.

LI, D., *et al.* A mutation at the Ala122 position of acetohydroxyacid synthase (AHAS) located on chromosome 6D of wheat: improved resistance to imidazolinone and a faster assay for marker assisted selection. **Molecular Breeding**. Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 217-225, 2008.

LIN, C., *et al.* A Built-In Strategy for Containment of Transgenic Plants: Creation of Selectively Terminable Transgenic Rice. **Plos One**. San Francisco, v. 3, n. 3, p. e1818, 2008.

LIU, B. M., *et al.* Characterizations and molecular mapping of a novel dominant semi-dwarf gene Sdd(t) in rice (*Oryza sativa*). **Plant Breeding**. Malden, v. 127, n. 2, p. 125-130, 2008.

LIU, K. e MUSE, S. V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**. Oxford, v. 21, n. 9, p. 2128-2129, 2005.

LIU, Y. B., *et al.* Backcrosses to Brassica napus of hybrids between B. juncea and B. napus as a source of herbicide-resistant volunteer-like feral populations. **Plant Science**. Clare, v. 179, n. 5, p. 459-465, 2010.

LIVORE, A. B., *et al.* **Rice plants having increased tolerance to imidazolinone herbicides**. Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria. United States. Patent Number: 20070028318. 2007.

LONDO, J. P., *et al.* Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 103, n. 25, p. 9578-9583, 2006.

LONDO, J. P. e SCHAAL, B. A. Origins and population genetics of weedy red rice in the USA. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 16, n. 21, p. 4523-4535, 2007.

LOWE, A., HARRIS, S. e ASHTON, P. **Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application**. Oxford: Wiley-Blackwell, v. 1, 2004. 344p.

LU, B.-R. e SNOW, A. A. Gene Flow from Genetically Modified Rice and Its Environmental Consequences. **Bioscience**. Washington, v. 55, n. 8, p. 669-678, 2005.

LU, B.-R. e YANG, C. Gene flow from genetically modified rice to its wild relatives: Assessing potential ecological consequences. **Biotechnology Advances**. Oxford, v. 27, n. 6, p. 1083-1091, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of Germination Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor. **Crop Science**. Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MAIA, E., *et al.* Método de comparação de modelos de regressão não-lineares em bananeiras. **Ciencia Rural**. Santa Maria, v. 39, n., p. 1380-1386, 2009.

MALIGA, P. PLASTID TRANSFORMATION IN HIGHER PLANTS. **Annual Review of Plant Biology**. Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 289-313, 2004.

MALONE, G., *et al.* Caracterização bioquímica e molecular de acessos de arroz vermelho coletados no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 37, n. 2, p. 77-85, 2007.

MANTEL, N. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. **Cancer Research**. Birmingham, v. 27, n. 2 Part 1, p. 209-220, 1967.

MAPA. SISLEGIS - Sistema de Consulta à Legislação. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/loginAction.do?method=exibirTela>> Acesso em: 15 set. 2010.

_____. RNC - Registro Nacional de Cultivares. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/proton/cultivarweb/cultivares_registradas.php?> Acesso em: 11 jan. 2011.

MARCHEZAN, E., MENEZES, N. L. D. e SIQUEIRA, C. D. A. Controle da qualidade das sementes de arroz irrigado utilizadas em Santa Maria/RS. **Ciencia Rural**. Santa Maria, v. 31, n., p. 375-379, 2001.

MASSON, J. A. e WEBSTER, E. P. Use of imazethapyr in water-seeded imidazolinone-tolerant rice (*Oryza sativa*). **Weed Technology**. Lacombe, v. 15, n. 1, p. 103-106, 2001.

MATSUI, T. e KAGATA, H. Characteristics of floral organs related to reliable self-pollination in rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany**. London, v. 91, n. 4, p. 473-477, 2003.

MCCOURT, J. A. e DUGGLEBY, R. G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. **Amino Acids**. New York, v. 31, n. 2, p. 173-210, 2006.

MCPHERSON, M., A., *et al.* Pollen-mediated gene flow from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) intended for plant molecular farming to conventional safflower. **Environmental Biosafety Research**. Cambridge, v. 8, n. 1, p. 19-32, 2009.

MEHROTRA, D. V., LU, X. M. e LI, X. M. Rank-Based Analyses of Stratified Experiments: Alternatives to the van Elteren Test. **American Statistician**. American Statistician, v. 64, n. 2, p. 121-130, 2010.

MENCHARI, Y., *et al.* Fitness costs associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. **Journal of Applied Ecology**. Malden, v. 45, n. 3, p. 939-947, 2008.

MENEZES, I. P. P., *et al.* Genetic diversity of mocó cotton (*Gossypium hirsutum* race marie-galante) from the northeast of Brazil: implications for conservation. **Botany**. Ipswich, v. 88, n. 8, p. 765-773, 2010.

MENEZES, V. G., *et al.* Caracterização de biótipos de arroz-vermelho em lavouras de arroz no estado do Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**. Londrina, v. 20, n., p. 221-227, 2002.

_____. Arroz-vermelho (*Oryza sativa*) resistente aos herbicidas imidazolinonas. **Planta Daninha**. Londrina, v. 27, n., p. 1047-1052, 2009.

MENEZES, V. G., MARIOT, C. H. P. Controle de plantas escape de arroz-vermelho no sistema de produção Clearfield® na cultura de arroz irrigado. CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., Porto Alegre, RS, 2009a. CD-ROM

_____. Controle arroz-vermelho em função da aspersão isolada de Only e em mistura com o glifosato. CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre, 2009b. CD-ROM

MERCER, K. L. e PERALES, H. R. Evolutionary response of landraces to climate change in centers of crop diversity. **Evolutionary Applications**. Malden, v. 3, n. 5-6, p. 480-493, 2010.

MEROTTO JR, A., JASIENIUK, M. e FISCHER, A. J. Estimating the outcrossing rate of *Cyperus difformis* using resistance to ALS-inhibiting herbicides and molecular markers. **Weed Research**. Oxford, v. 49, n. 1, p. 29-36, 2009.

MEROTTO JR, A., *et al.* Germinação de sementes de cultivares de arroz (*Oryza sativa*) resistentes a inibidores da enzima ALS. In: 5 Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado e 27 Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Pelotas, RS **Anais**. UFPEL, 2007. 276-278 p.

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**. New York, v. 103, n. 8, p. 1151-1159, 2001.

_____. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. **Molecular Breeding**. Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 103-112, 2004.

MICHIELS, F. e JOHNSON, K. **Glufosinate tolerant rice**. Plant Genetic Systems, N.V. (Gent, BE). United States. Patent Number: 6333449. 2001.

MORAES, P. V. D., *et al.* Competitividade relativa de soja com arroz-vermelho. **Planta Daninha**. Londrina, v. 27, n., p. 35-40, 2009.

MUSSGNUMG, F., *et al.* Yield gaps and nutrient balances in intensive, rice-based cropping systems on degraded soils in the Red River Delta of Vietnam. **Field Crops Research**. Amsterdam, v. 98, n. 2-3, p. 127-140, 2006.

NADER, S., *et al.* Growth and fitness of triazine-susceptible and triazine-resistant common waterhemp (*Amaranthus tuberculatus* var. *rudis*). **Weed Biology and Management**. Oxford, v. 8, n. 2, p. 73-77, 2008.

NARZARY, D., RANA, T. S. e RANA, S. A. Genetic diversity in inter-simple sequence repeat profiles across natural populations of Indian pomegranate (*Punica granatum* L.). **Plant Biology**. Malden, v. 12, n. 5, p. 806-813, 2010.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

_____. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. Baltimore, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NEI, M., TAJIMA, F. e TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. **Journal of Molecular Evolution**. New York, v. 19, n. 2, p. 153-170, 1983.

NEIGEL, J. E. Is F_{ST} obsolete? **Conservation Genetics**. Dordrecht, v. 3, n. 2, p. 167-173, 2002.

NIRUNTRAYAKUL, S., RERKASEM, B. e JAMJOD, S. Crossability between cultivated rice (*Oryza sativa*) and common wild rice (*O. rufipogon*) and characterization of F-1 and F-2 populations. **ScienceAsia**. Bangkok, v. 35, n. 2, p. 161-169, 2009.

NOLDIN, J. A., CHANDLER, J. M. e MCCAULEY, G. N. Red rice (*Oryza sativa*) biology. I. Characterization of red rice ecotypes. **Weed Technology**. Lacombe, v. 13, n. 1, p. 12-18, 1999.

_____. Seed longevity of red rice ecotypes buried in soil. **Planta Daninha**. Londrina, v. 24, n., p. 611-620, 2006.

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**. Londrina, v. 20, n., p. 243-251, 2002.

_____. Desempenho de populações híbridas F2 de arroz-vermelho (*Oryza sativa*) com arroz transgênico (*O. sativa*) resistente ao herbicida amônio-glufosinato. **Planta Daninha**. Londrina, v. 22, n., p. 381-395, 2004.

OARD, J., *et al.* Field evaluation of seed production, shattering, and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed, red rice (*Oryza sativa*). **Plant Science**. Clare, v. 157, n. 1, p. 13-22, 2000.

OBLESSUC, P. R., *et al.* Adaptation of fluorescent technique for genotyping with new microsatellite markers in common bean. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. Brasília, v. 44, n., p. 638-644, 2009.

OLIVEIRA, M. B., VIEIRA, E. S. N. e SCHUSTER, I. Construction of a molecular database for soybean cultivar identification in Brazil. **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 705-720, 2010.

OLSEN, K. M., CAICEDO, A. L. e JIA, Y. Evolutionary Genomics of Weedy Rice in the USA. **Journal of Integrative Plant Biology**. Beijing, v. 49, n. 6, p. 811-816, 2007.

ONISHI, K., *et al.* Different patterns of genealogical relationships found in the two major QTLs causing reduction of seed shattering during rice domestication. **Genome**. Ottawa, v. 50, n. 8, p. 757-766, 2007.

ONOFRI, A., *et al.* Current statistical issues in Weed Research. **Weed Research**. Oxford, v. 50, n. 1, p. 5-24, 2010.

ORR, H. A. The genetic theory of adaptation: a brief history. **Nature Reviews Genetics**. London, v. 6, n. 2, p. 119-127, 2005.

_____. The population genetics of beneficial mutations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**. London, v. 365, n. 1544, p. 1195-1201, 2010.

PARIS, M., *et al.* The effects of the genetic background on herbicide resistance fitness cost and its associated dominance in *Arabidopsis thaliana*. **Heredity**. London, v. 101, n. 6, p. 499-506, 2008.

PARK, K. W. e MALLORY-SMITH, C. A. Multiple herbicide resistance in downy brome (*Bromus tectorum*) and its impact on fitness. **Weed Science**. Champaign, v. 53, n. 6, p. 780-786, 2005.

PARK, K. W., *et al.* Ecological fitness of acetolactate synthase inhibitor-resistant and -susceptible downy brome (*Bromus tectorum*) biotypes. **Weed Science**. Champaign, v. 52, n. 5, p. 768-773, 2004.

PAYTON, M. E., *et al.* Transformations of count data for tests of interaction in factorial and split-plot experiments. **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v. 99, n. 3, p. 1002-1006, 2006.

PEAKALL, R. O. D. e SMOUSE, P. E. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**. Oxford, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

POWLES, S. B. e YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**. Palo Alto, v. 61, n., p. 317-47, 2010.

PRESTON, C. e POWLES, S. B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**. London, v. 88, n. 1, p. 8-13, 2002.

PRESTON, C., *et al.* Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 84, n. 3, p. 227-235, 2006.

PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. e DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**. Baltimore, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PRITCHARD, L., *et al.* A general model of error-prone PCR. **Journal of Theoretical Biology**. London, v. 234, n. 4, p. 497-509, 2005.

QIAO, F., *et al.* Modification of plant height via RNAi suppression of *OsGA20* gene in rice. **Euphytica**. Wageningen, v. 158, n. 1, p. 35-45, 2007.

RAJGURU, S. N., *et al.* Mutations in the red rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. **Weed Science**. Champaign, v. 53, n. 6, p. 946-946, 2005.

RANGEL, P. N., *et al.* Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the interspecific cross *Oryza sativa* (BG90-2) x *Oryza glumaepatula* (RS-16). **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, v. 7, n. 1, p. 184-195, 2008.

RATKOWSKY, D. A. **Handbook of nonlinear regression models**. New York: M. Dekker, v. 107, 1990. 241p. (Statistics, textbooks and monographs)

REAGON, M., *et al.* Genomic patterns of nucleotide diversity in divergent populations of US weedy rice. **BMC Evolutionary Biology**. London, v. 10, n., p., 2010.

REGAZZI, A. J. Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. **Revista Ceres**. Viçosa, v. 50, n. 287, p. 9-26, 2003.

REGAZZI, A. J. e SILVA, C. H. O. Testes para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear em dados de experimento com delineamento em blocos casualizados. **Revista Ceres**. Viçosa, v. 57, n. 3, p. 315-320, 2010.

REN, F. G., *et al.* A comparative study of genetic relationships among the AA-genome *Oryza* species using RAPD and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v. 108, n. 1, p. 113-120, 2003.

RODENBURG, J. e DEMONT, M. Potential of herbicide-resistant rice technologies for sub-Saharan Africa. **AgBioForum**. Columbia, v. 12, n. 3&4, p. 313-325, 2009.

ROGNLI, O. A., NILSSON, N.-O. e NURMINIEMI, M. Effects of distance and pollen competition on gene flow in the wind-pollinated grass *Festuca pratensis* Huds. **Heredity**. London, v. 85, n. 6, p. 550-560, 2000.

RONG, J., *et al.* Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields. **New Phytologist**. Malden, v. 173, n. 2, p. 346-353, 2007.

_____. Low frequency of transgene flow from Bt/CpTI rice to its nontransgenic counterparts planted at close spacing. **New Phytologist**. Malden, v. 168, n. 3, p. 559-566, 2005.

_____. Modelling pollen-mediated gene flow in rice: risk assessment and management of transgene escape. **Plant Biotechnology Journal**. Bristol, v. 8, n. 4, p. 452-464, 2010.

_____. Asymmetric gene flow between traditional and hybrid rice varieties (*Oryza sativa*) indicated by nuclear simple sequence repeats and implications for germplasm conservation. **New Phytologist**. Malden, v. 163, n. 2, p. 439-445, 2004.

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**. Amsterdam, 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**. Londrina, v. 28, n., p. 411-419, 2010b.

ROULIN, A., *et al.* Paleogenomic Analysis of the Short Arm of Chromosome 3 Reveals the History of the African and Asian Progenitors of Cultivated Rices. **Genome Biology and Evolution**. Oxford, v. 2, n., p. 132-139, 2010.

ROYO-ESNAL, A., *et al.* Modeling the Emergence of Three Arable Bedstraw (*Galium*) Species. **Weed Science**. Champaign, v. 58, n. 1, p. 10-15, 2010.

SAHOO, L., *et al.* Growth and fitness components of wild x cultivated *Sorghum bicolor* (poaceae) hybrids in Nebraska. **American Journal of Botany**. Saint Louis, v. 97, n. 10, p. 1610-1617, 2010.

SALES, M. A., *et al.* Amino acid substitutions in the acetolactate synthase gene red rice (*Oryza sativa*) confer resistance to imazethapyr. **Weed Science**. Champaign, v. 56, n. 4, p. 485-489, 2008.

SÁNCHEZ-OLQUÍN, E., ARRIETA-ESPINOZA, G. e ESPINOZA ESQUIVEL, A. M. Vegetative and reproductive development of Costa Rican weedy rice compared with commercial rice (*Oryza sativa*). **Planta Daninha**. Londrina, v. 25, n., p. 13-23, 2007.

SANCHEZ OLGUIN, E., *et al.* Assessment of gene flow from a herbicide-resistant indica rice (*Oryza sativa* L.) to the Costa Rican weedy rice (*Oryza sativa*) in Tropical America: factors affecting hybridization rates and characterization of F1 hybrids. **Transgenic Research**. Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 633-647, 2009.

SANTOS, F. M., *et al.* Controle químico de arroz-vermelho na cultura do arroz irrigado. **Planta Daninha**. Londrina, v. 25, n., p. 405-412, 2007.

SAS INSTITUTE INC. **Base SAS® 9.1 Procedures Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**. London, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SCHWANKE, A. M. L., *et al.* Caracterização morfológica de ecótipos de arroz daninho (*Oryza sativa*) provenientes de áreas de arroz irrigado. **Planta Daninha**. Londrina, v. 26, n., p. 249-260, 2008.

SCOTT, A. e WILD, C. Transformations and R^2 . **American Statistician**. American Statistician, v. 45, n. 2, p. 127-129, 1991.

SECOND, G. Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza spp.*): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. **The Japanese journal of genetics**. Mishima, v. 57, n. 1, p. 25-57, 1982.

SHIVRAIN, V. K., *et al.* Genetic diversity of weedy red rice (*Oryza sativa*) in Arkansas, USA. **Weed Research**. Oxford, v. 50, n. 4, p. 289-302, 2010a.

_____. Gene flow between Clearfield(TM) rice and red rice. **Crop Protection**. Oxford, v. 26, n. 3, p. 349-356, 2007.

_____. Maximum Outcrossing Rate and Genetic Compatibility between Red Rice (*Oryza sativa*) Biotypes and Clearfield (TM) Rice. **Weed Science**. Champaign, v. 56, n. 6, p. 807-813, 2008.

_____. Gene flow from weedy red rice (*Oryza sativa* L.) to cultivated rice and fitness of hybrids. **Pest Management Science**. Malden, v. 65, n. 10, p. 1124-1129, 2009a.

_____. Characterization of spontaneous crosses between clearfield rice (*Oryza sativa*) and red rice (*Oryza sativa*). **Weed Technology**. Lacombe, v. 20, n. 3, p. 576-584, 2006.

_____. Polymorphisms in the ALS gene of weedy rice (*Oryza sativa* L.) accessions with differential tolerance to imazethapyr. **Crop Protection**. Oxford, v. 29, n. 4, p. 336-341, 2010b.

_____. Factors Affecting the Outcrossing Rate between Clearfield™ Rice and Red Rice (*Oryza sativa*). **Weed Science**. Champaign, v. 57, n. 4, p. 394-403, 2009b.

_____. Diversity of weedy red rice (*Oryza sativa* L.) in Arkansas, USA in relation to weed management. **Crop Protection**. Oxford, v. 29, n. 7, p. 721-730, 2010c.

SIBONY, M. e RUBIN, B. The ecological fitness of ALS-resistant *Amaranthus retroflexus* and multiple-resistant *Amaranthus blitoides*. **Weed Research**. Oxford, v. 43, n. 1, p. 40-47, 2003.

SINGH, B., *et al.* Arabidopsis Acetohydroxyacid Synthase Expressed in *Escherichia coli* is Insensitive to the Feedback Inhibitors. **Plant Physiology**. Rockville, v. 99, n. 3, p. 812-816, 1992.

SLARKIN, M. Gene Flow in Natural Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v. 16, n. 1, p. 393-430, 1985.

SLAVOV, G. T., *et al.* Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 14, n. 10, p. 3109-3121, 2005.

_____. Highly variable SSR markers in Douglas-fir: Mendelian inheritance and map locations. **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v. 108, n. 5, p. 873-880, 2004.

SMOUSE, P. E., LONG, J. C. e SOKAL, R. R. Multiple Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence. **Systematic Biology**. Washington, v. 35, n. 4, p. 627-632, 1986.

SNOW, A. A., *et al.* Long-term persistence of crop alleles in weedy populations of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **New Phytologist**. Malden, v. 186, n. 2, p. 537-548, 2010.

SNOW, A. A., UTHUS, K. L. e CULLEY, T. M. Fitness of hybrids between weedy and cultivated radish: Implications for weed evolution. **Ecological Applications**. Washington, v. 11, n. 3, p. 934-943, 2001.

SONG, X. L., *et al.* Potential gene flow from transgenic rice (*Oryza sativa* L.) to different weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) accessions based on reproductive compatibility. **Pest Management Science**. Malden, v. 65, n. 8, p. 862-869, 2009.

SONG, Z., LU, B.-R. e CHEN, J. Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions. **Biodiversity and Conservation**. Dordrecht, v. 13, n. 3, p. 579-590, 2004.

SONG, Z., *et al.* Pollen competition between cultivated and wild rice species (*Oryza sativa* and *O. rufipogon*). **New Phytologist**. Malden, v. 153, n. 2, p. 289-296, 2002.

SONG, Z. P., *et al.* Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. **New Phytologist**. Malden, v. 157, n. 3, p. 657-665, 2003.

SOSBAI. SOCIEDADE BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas, 2010. 188 p.

SOUZA, P. R. Situação do Arroz vermelho no Rio Grande do Sul, In: SEMINÁRIO LATINO AMERICANO SOBRE ARROZ VERMELHO, Porto Alegre, 1998. **Anais...** Porto Alegre, 2001, p. 35-37.

SPIELMEYER, W., ELLIS, M. H. e CHANDLER, P. M. Semidwarf (sd-1), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 99, n. 13, p. 9043-9048, 2002.

SPSS Inc. **SPSS Statistics Base 17.0 User’s Guide**. Chicago IL: SPSS Inc., 2008.

STEELE, G. L., CHANDLER, J. M. e MCCAULEY, G. N. Control of Red Rice (*Oryza sativa*) in Imidazolinone-Tolerant Rice (*O. sativa*). **Weed Technology**. Lacombe, v. 16, n. 3, p. 627-630, 2002.

SUH, H. S., SATO, Y. I. e MORISHIMA, H. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v. 94, n. 3, p. 316-321, 1997.

SUNDARAM, R., *et al.* Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. **Euphytica**. Wageningen, v. 163, n. 2, p. 215-224, 2008.

SUNDARAMOORTHI, J., BABU, C. e RAM, S. G. Molecular diversity in the primary and secondary gene pools of genus *Oryza*. **Plant Systematics and Evolution**. Wien, v. 279, n. 1-4, p. 115-123, 2009.

SWEENEY, M. e MCCOUCH, S. The Complex History of the Domestication of Rice. **Annals of Botany**. London, v. 100, n. 5, p. 951-957, 2007.

TAMURA, K., *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TAN, S., *et al.* Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**. Malden, v. 61, n. 3, p. 246-257, 2005.

TEMPLETON, A. R. **Gene Flow and Population Subdivision**: John Wiley & Sons, Inc., v., 2006a. 168-203p. (Population Genetics and Microevolutionary Theory)

_____. **Systems of Mating**: John Wiley & Sons, Inc., v., 2006b. 48-81p. (Population Genetics and Microevolutionary Theory)

TEW, T. L. e PAN, Y. B. Microsatellite (Simple Sequence Repeat) Marker-based Paternity Analysis of a Seven-Parent Sugarcane Polycross. **Crop Science**. Madison, v. 50, n. 4, p. 1401-1408, 2010.

THOMPSON, C. R., THILL, D. C. e SHAFII, B. Growth and Competitiveness of Sulfonylurea-Resistant and -Susceptible Kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**. Champaign, v. 42, n. 2, p. 172-179, 1994.

THURBER, C. S., *et al.* Molecular evolution of shattering loci in US weedy rice. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 19, n. 16, p. 3271-3284, 2010.

TRANEL, P.J., WRIGHT, T.R, AND HEAP, I.M. ALS mutations from herbicide-resistant weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em: 05 fev. 2011.

TREZZI, M. M., *et al.* Características morfofisiológicas de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência a diferentes mecanismos de ação herbicida. **Planta Daninha**. Londrina, v. 27, n., p. 1075-1082, 2009.

UDUPA, S. M. e BAUM, M. High mutation rate and mutational bias at (TAA)(n) microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Molecular Genetics and Genomics**. Heidelberg, v. 265, n. 6, p. 1097-1103, 2001.

UMA, M. S., *et al.* Microsatellite DNA marker aided diversity analysis in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**. New Delhi, v. 69, n. 1, p. 35-43, 2009.

URZAY, J., *et al.* Wind gusts and plant aeroelasticity effects on the aerodynamics of pollen shedding: A hypothetical turbulence-initiated wind-pollination mechanism. **Journal of Theoretical Biology**. London, v. 259, n. 4, p. 785-792, 2009.

UYSAL, H., *et al.* Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**. New York, v. 57, n. 7, p. 1109-1119, 2010.

VARSHNEY, R. K., GRANER, A. e SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**. London, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.

VAUGHAN, D. A. **The genus *Oryza* L. Current status of taxonomy**. Manila, v., 1989. 21p.

VAUGHAN, L. K., *et al.* Is all red rice found in commercial rice really *Oryza sativa*? **Weed Science**. Champaign, v. 49, n. 4, p. 468-476, 2001.

VAZ, A. R. D., *et al.* Genetic analysis of a local population of *Oryza glumaepatula* using SSR markers: implications for management and conservation programs. **Genetica**. New York, v. 137, n. 2, p. 221-231, 2009.

VERNETTI JUNIOR, F. D. J., GOMES, A. D. S. e SCHUCH, L. O. B. Sustentabilidade de sistemas de rotação e sucessão de culturas em solos de várzea no Sul do Brasil. **Ciencia Rural**. Santa Maria, v. 39, n., p. 1708-1714, 2009.

VILA-AIUB, M. M., NEVE, P. e POWLES, S. B. Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. **New Phytologist**. Malden, v. 167, n., p. 787-796, 2005a.

_____. Evidence for an ecological cost of enhanced herbicide metabolism in *Lolium rigidum*. **Journal of Ecology**. Malden, v. 97, n. 4, p. 772-780, 2009a.

_____. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**. Malden, v. 184, n. 4, p. 751-767, 2009b.

VILA-AIUB, M. M., *et al.* Ecological fitness of a multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* population: dynamics of seed germination and seedling emergence of resistant and susceptible phenotypes. **Journal of Applied Ecology**. Malden, v. 42, n. 2, p. 288-298, 2005b.

VILLA, S. C. C., *et al.* Controle de arroz-vermelho em dois genótipos de arroz (*Oryza sativa*) tolerantes a herbicidas do grupo das imidazolinonas. **Planta Daninha**. Londrina, v. 24, n., p. 549-555, 2006.

VONESH, E. F., CHINCHILLI, V. P. e PU, K. W. Goodness-of-fit in generalized nonlinear mixed-effects models. **Biometrics**. Malden, v. 52, n. 2, p. 572-587, 1996.

WANG, T., *et al.* A herbicide-resistant ACCase 1781 *Setaria* mutant shows higher fitness than wild type. **Heredity**. London, v. 105, n. 4, p. 394-400, 2010.

WARD, S. M. e JASIENIUK, M. Review: Sampling Weedy and Invasive Plant Populations for Genetic Diversity Analysis. **Weed Science**. Champaign, v. 57, n. 6, p. 593-602, 2009.

WARWICK, S. I., *et al.* Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 17, n. 5, p. 1387-1395, 2008.

WEBSTER, E. P. e MASSON, J. A. Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. **Weed Science**. Champaign, v. 49, n. 5, p. 652-657, 2001.

WELCH, B. L. On the Comparison of Several Mean Values: An Alternative Approach. **Biometrika**. Oxford, v. 38, n. 3, p. 330-336, 1951.

WENEFRIDA, I., *et al.* Herbicide resistance profiles in Clearfield rice. In: Thirtieth Rice Technical Working Group. New Orleans, Louisiana **Proceedings**. Louisiana State University Agricultural Center, 2004. 242 p.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**. Baltimore, v. 28, n. 2, p. 114-138, 1943.

_____. The genetic structure of populations. **Annals of Eugenics**. New York, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1951.

XIA, H.-B., *et al.* Conspecific Crop-Weed Introgression Influences Evolution of Weedy Rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) across a Geographical Range. **Plos One**. San Francisco, v. 6, n. 1, p. e16189, 2011.

YAO, K. M., *et al.* Establishment of a rice transgene flow model for predicting maximum distances of gene flow in Southern China. **New Phytologist**. Malden, v. 180, n. 1, p. 217-228, 2008.

YOSHIDA, H., *et al.* superwoman1-cleistogamy, a hopeful allele for gene containment in GM rice. **Plant Biotechnology Journal**. Bristol, v. 5, n. 6, p. 835-846, 2007.

YU, Q., *et al.* AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 61, n. 14, p. 3925-3934, 2010.

_____. Molecular characterisation of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. **Pest Management Science**. Malden, v. 63, n. 9, p. 918-927, 2007.

ZHANG, D., *et al.* Genetic structure and differentiation of *Oryza sativa* L. in China revealed by microsatellites. **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v. 119, n. 6, p. 1105-1117, 2009.

ZHANG, N. Y., LINScombe, S. e OARD, J. Out-crossing frequency and genetic analysis of hybrids between transgenic glufosinate herbicide-resistant rice and the weed, red rice. **Euphytica**. Wageningen, v. 130, n. 1, p. 35-45, 2003.

ZHAO, Z. J. The Middle Yangtze region in China is one place where rice was domesticated: phytolith evidence from the Diaotonghuan Cave, Northern Jiangxi. **Antiquity**. Cambridge, v. 72, n. 278, p. 885-897, 1998.

ZHENG, F. e ZHU, J. A. Coupled assimilation for an intermediated coupled ENSO prediction model. **Ocean Dynamics**. Heidelberg, v. 60, n. 5, p. 1061-1073, 2010.

ZHOU, M., *et al.* Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase using a directed evolution strategy. **Plant Physiology**. Rockville, v. 140, n. 1, p. 184-195, 2006.

ZHU, Q. e GE, S. Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus *Oryza* revealed by intron sequences of four nuclear genes. **New Phytologist**. Malden, v. 167, n. 1, p. 249-265, 2005.

ZIMMERMANN, F. J. P. **Estatística aplicada à pesquisa agrícola**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, v. 1, 2004. 402p.

7 APÊNCIDES

APÊNDICE 1. Protocolo utilizado na extração de DNA das plantas de *Oryza sativa*

1. Ligar o banho-maria a 65°C
2. Preparar a solução tampão com 1 hora de antecedência.
Quantidades para 10 amostras: 6500uL (fazer 10% a mais)

Tris pH 8,0 1M	650uL
EDTA 0,5	260uL
NaCl 5M	1820ul
CTAB 2%	0,13g
PVP 1%	0,26g
Água	3770uL
3. Aquecer tampão em banho-maria (1 hora antes)
4. Macerar o tecido em nitrogênio líquido. A maceração deve ser muito bem feita, devendo o tecido ficar totalmente moído.
5. Adicionar 650 uL da solução tampão.
6. Incubar por 30 min a 65°C, mexendo a cada 10 minutos.
7. Adicionar 550 uL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e mexer por 5 minutos.
8. Centrifugar por 5 min a 10 000 rpm em temperatura ambiente.
9. Transferir o máximo possível de sobrenadante para um novo tubo (de 1,5mL).
10. Adicionar 17% do volume do sobrenadante de RNase (10mg/mL).
Exemplos: 300uL de sobrenadante - 50uL de RNase; 400uL – 68uL; 450uL – 76uL
11. Incubar por 60min a 37°C. Preferível em banho-maria, mas poder ser realizado no shaker. Esta etapa pode ser substituída por incubação em geladeira por no mínimo 8 horas.
12. Precipitar o DNA adicionando 67% do volume do sobrenadante de isopropanol, mexendo levemente.
Exemplos: 300uL de sobrenadante – 200ul de isopropanol; 400uL – 270uL; 450uL – 300uL. É possível colocar na geladeira durante a noite, ou freezer por 15 min.

13. Centrifugar por 30 min a 14 000 rpm, para formar o pellet.
14. Descartar a solução e lavar o pellet com de 500uL etanol 70%. Atenção para o pellet, pois este pode soltar da parede do tubo. Descartar o etanol.
15. Secar bem o pellet.
16. Ressuspender o DNA em 30uL de TE pH8 1x (ou água miliQ).

APÊNDICE 2. Questionário de coleta das populações de arroz vermelho em lavouras do RS. Porto Alegre, RS. 2010.

Pop	Local	Coordenadas		Cultivares ultimas 5 safras				
				2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10
2	Arroio Grande 1	32°13'00"S	53°00'36"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL
5	Arroio Grande 2	31°59'58"S	52°37'36"O	IRGA 424	IRGA 424	IRGA 424	IRGA 424	IRGA 424
6	Arroio Grande 3	32°24'26"S	52°54'04"O	Pousio	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL
7	Santa Margarida do Sul 1	29°41'00"S	53°48'00"O	-	-	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
8	Santa Margarida do Sul 2	30°11'22"S	54°06'28"O	-	-	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
9	São Gabriel 1	30°28'55"S	54°29'39"O	-	-	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
10	São Gabriel 2	30°30'01"S	54°23'36"O	-	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL	IRGA 424
11	São Gabriel 3	30°14'15"S	54°21'40"O	-	-	-	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
12	São Gabriel 4	30°13'04"S	54°33'55"O	-	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
13	Cacequi 1	29°57'32"S	54°54'20"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL
14	Cacequi 2	29°56'12"S	54°54'33"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
15	Cacequi 3	29°52'03"S	54°46'21"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
16	Cacequi 4	29°53'07"S	54°52'39"O	-	-	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
17	Cacequi 5	29°51'44"S	54°08'02"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
18	Cacequi 6	29°48'44"S	54°01'20"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	-	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
20	Santo Antônio da Patrulha 1	29°58'44"S	50°25'50"O	-	-	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL
21	Santo Antônio da Patrulha 2	29°55'10"S	50°37'06"O	-	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL
24	Campo Bom	29°42'06"S	51°02'56"O	-	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL
25	Manoel Viana 1	29°36'48"S	55°29'04"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL
27	Harmonia	29°58'36"S	56°09'46"O	-	-	IRGA 417	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
28	Manoel Viana 2	29°33'56"S	55°29'47"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
29	Alegrete	29°22'53"S	55°56'37"O	-	Pousio	Pousio	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
30	Caverá	29°86'01"S	55°71'27"O	-	-	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
31	Agudo 1	29°45'28"S	52°57'56"O	IRGA 420	IRGA 422 CL	Tuno CL	EP 115 CL	EP 115 CL
32	Agudo 2	29°31'16"S	53°18'53"O	IRGA 417	IRGA 417	IRGA 417	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
33	Agudo 3	29°36'49"S	53°19'14"O	-	-	-	PUITÁ INTA CL	PUITÁ INTA CL
34	Agudo 4	29°49'38"S	53°19'34"O	IRGA 422 CL	IRGA 422 CL	IRGA 414	Querência	PUITÁ INTA CL

continuação APÊNDICE 2. Questionário de coleta das populações de arroz vermelho em lavouras do RS. Porto Alegre, RS. 2010.

Pop	Local	Origem das sementes	Resistencia anterior	Controle de escapes	Rotação de culturas	Máquinas utilizada na colheita	Herbicidas utilizados nas ultimas safras	
							2005/06	
							1ª aplicação	2ª aplicação
2	Arroio Grande 1	Terceiros	capim arroz	herbicida	não	terceirizadas	imazethapyr/imazapic	-
5	Arroio Grande 2	Certificada	arroz vermelho	manual	soja	próprias	imazethapyr/imazapic	imazethapyr/imazapic
6	Arroio Grande 3	Certificada	arroz vermelho	manual	não	próprias	glyphosate	imazethapyr/imazapic
7	Santa Margarida do Sul 1	propria/certificada	não	nenhuma	não	próprias	-	-
8	Santa Margarida do Sul 2	propria/certificada	não	nenhuma	soja	próprias	-	-
9	São Gabriel 1	Certificada	não	nenhuma	soja	próprias	-	-
10	São Gabriel 2	propria/certificada	não	nenhuma	soja	próprias	-	-
11	São Gabriel 3	Certificada	não	nenhuma	soja	próprias	-	-
12	São Gabriel 4	propria/certificada	arroz vermelho	nenhuma	não	próprias	-	-
13	Cacequi 1	propria/terceiros	não	nenhuma	não	próprias	imazethapyr/metsulfuron	-
14	Cacequi 2	Próprias	não	nenhuma	não	próprias	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron
15	Cacequi 3	Terceiros	não	nenhuma	não	próprias	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron
16	Cacequi 4	Terceiros	não	nenhuma	não	terceirizadas	imazethapyr	-
17	Cacequi 5	propria/terceiros	não	nenhuma	não	próprias	glyphosate/imazethapyr	imazethapyr
18	Cacequi 6	propria/terceiros	não	nenhuma	milho	próprias	imazethapyr	atrazine
20	Santo Antônio da Patrulha 1	Certificada	não	nenhuma	não	próprias	-	-
21	Santo Antônio da Patrulha 2	Certificada	não	nenhuma	não	próprias	imazethapyr	-
24	Campo Bom	Certificada	não	nenhuma	não	próprias	imazethapyr/imazapic	-
25	Manoel Viana 1	Terceiros	não	manual	não	próprias	imazethapyr	imazethapyr/imazapic
27	Harmonia	Terceiros	não	nenhuma	não	próprias	-	-
28	Manoel Viana 2	Terceiros	não	manual	não	próprias	imazethapyr	imazethapyr/imazapic
29	Alegrete	Terceiros	não	nenhuma	não	próprias	-	-
30	Caverá	Terceiros	não	herbicida	não	próprias	-	-
31	Agudo 1	propria/certificada	arroz vermelho	herbicida	azevém	próprias	pendimethalin	-
32	Agudo 2	propria/terceiros	arroz vermelho	manual	não	próprias	pendimethalin	-
33	Agudo 3	Terceiros	não	manual	não	próprias	-	-
34	Agudo 4	Próprias	arroz vermelho	nenhuma	não	próprias	imazethapyr	-

continuação APÊNDICE 2. Questionário de coleta das populações de arroz vermelho em lavouras do RS. Porto Alegre, RS. 2010.

Local	Herbicidas utilizados nas ultimas safras							
	2006/07		2007/08		2008/09		2009/10	
	1ª aplicação	2ª aplicação	1ª aplicação	2ª aplicação	1ª aplicação	2ª aplicação	1ª aplicação	2ª aplicação
A. Grande 1	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	-
A. Grande 2	imazethapyr/imazapic	imazethapyr/imazapic	imazethapyr/imazapic	imazethapyr/imazapic	imazethapyr/imazapic	imazethapyr/imazapic	imazethapyr/imazapic	imazethapyr/imazapic
A. Grande 3	glyphosate	imazethapyr/imazapic	glyphosate	imazethapyr/imazapic	glyphosate	imazethapyr/imazapic	glyphosate	imazethapyr/imazapic
S.M. do Sul 1	-	-	-	-	-	-	glyphosate	imazethapyr
S.M. do Sul 2	-	-	-	-	-	-	glyphosate	imazethapyr
São Gabriel 1	-	-	-	-	-	-	glyphosate	imazethapyr
São Gabriel 2	-	-	-	-	-	-	glyphosate	clomazone
São Gabriel 3	-	-	-	-	-	-	imazethapyr	-
São Gabriel 4	-	-	-	-	-	-	clomazone	imazethapyr
Cacequi 1	imazethapyr/metsulfuron	-	imazethapyr/metsulfuron	-	imazethapyr/metsulfuron	-	imazethapyr/metsulfuron	-
Cacequi 2	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron
Cacequi 3	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron	glyphosate	imazethapyr/metsulfuron
Cacequi 4	imazethapyr	-	imazethapyr	-	imazethapyr	-	imazethapyr	-
Cacequi 5	glyphosate/imazethapyr	imazethapyr	glyphosate/imazethapyr	imazethapyr	glyphosate/imazethapyr	imazethapyr	glyphosate/imazethapyr	imazethapyr
Cacequi 6	imazethapyr	atrazine	imazethapyr	atrazine	imazethapyr	atrazine	imazethapyr	atrazine
S.A. Patrulha 1	-	-	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	-
S.A. Patrulha 2	imazethapyr	-	imazethapyr	-	imazethapyr	-	imazethapyr	-
Campo Bom	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	-
M.Viana 1	imazethapyr	imazethapyr/imazapic	imazethapyr	imazethapyr/imazapic	imazethapyr	imazethapyr/imazapic	imazethapyr	imazethapyr/imazapic
Harmonia	-	-	-	-	imazethapyr	imazethapyr/imazapic	imazethapyr	imazethapyr/imazapic
M. Viana 2	imazethapyr	imazethapyr/imazapic	imazethapyr	imazethapyr/imazapic	imazethapyr	imazethapyr/imazapic	imazethapyr	imazethapyr/imazapic
Alegrete	-	-	-	-	imazethapyr	imazethapyr	imazethapyr	imazethapyr
Caverá	-	-	imazethapyr	imazethapyr	imazethapyr	imazethapyr	imazethapyr	imazethapyr
Agudo 1	imazethapyr	-	imazethapyr/imazapic	-	imazethapyr/imazapic	imazethapyr	imazethapyr	-
Agudo 2	pendimethalin	-	pendimethalin	-	imazethapyr	-	imazethapyr	-
Agudo 3	-	-	-	-	imazethapyr	-	imazethapyr	-
Agudo 4	imazethapyr	-	penoxulam	-	penoxulam	-	imazethapyr	-

APÊNDICE 3. Genotipagem de 176 acessos de arroz vermelho com quatro marcadores SSR. SI, seleção independente. FG, fluxo gênico. Porto Alegre, RS.2010.

População	ID	Marcador molecular SSR				Mutação			Origem da resistência
		4797	RM341	RM251	RM475	G ₆₅₄ E	S ₆₅₃ N	A ₁₂₂ T	
Caçapava do Sul	1	129/129	157/157	147/147	212/212	x			FG
Caçapava do Sul	2	129/129	157/157	129/147	212/212	x			FG
Caçapava do Sul	3	135/135	157/157	134/134	212/212	x			FG
Caçapava do Sul	4	129/129	157/157	129/134	212/216	x			FG
Caçapava do Sul	5	129/135	155/155	129/134	212/212	x			FG
Caçapava do Sul	6	135/135	152/157	151/151	212/216	x			FG
Caçapava do Sul	7	129/129	157/157	129/134	212/212	x			FG
Caçapava do Sul	8	129/129	157/157	129/129	212/216	x			FG
Caçapava do Sul	9	129/129	-/-	129/129	-/-	x			FG
Caçapava do Sul	10	135/135	-/-	147/147	212/216	x			FG
Caçapava do Sul	11	129/129	157/157	129/129	-/-	x			FG
Caçapava do Sul	12	129/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
Caçapava do Sul	13	135/135	157/157	147/147	212/212	x			FG
Caçapava do Sul	14	129/129	157/157	129/129	212/212	x			FG
Caçapava do Sul	15	135/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 1	16	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 1	17	135/135	155/155	147/151	212/216	x			SI
São Martinho da Serra 1	18	129/135	157/187	129/151	212/216	x			FG
São Martinho da Serra 1	20	129/129	157/157	163/163	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 1	23	129/135	157/157	134/134	212/216	x			FG
São Martinho da Serra 1	24	129/129	157/157	151/151	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 1	25	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 1	26	129/129	157/157	153/153	212/216	x			FG
São Martinho da Serra 1	27	129/129	157/157	129/129	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 1	28	129/129	157/157	129/147	216/216	x			FG
São Martinho da Serra 1	29	129/129	152/157	129/129	-/-	x			FG
São Martinho da Serra 1	30	129/129	157/157	143/143	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	31	135/135	157/157	134/147	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	32	129/129	157/157	147/147	216/216	x			FG
São Martinho da Serra 2	33	129/129	157/157	147/147	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	34	129/129	152/152	151/151	216/216	x			FG
São Martinho da Serra 2	35	129/129	157/157	129/147	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	36	129/129	157/157	129/129	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	37	129/129	157/157	134/147	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	38	129/129	157/157	147/147	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	39	135/135	152/152	134/151	216/216	x			SI
São Martinho da Serra 2	40	129/129	157/157	129/147	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	41	135/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	42	135/135	157/157	134/134	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	43	129/129	157/157	147/147	216/216	x			FG
São Martinho da Serra 2	44	135/135	157/157	134/151	212/212	x			FG
São Martinho da Serra 2	45	129/129	152/152	151/151	216/216	x			FG

continuação APÊNDICE 3. Genotipagem de 176 acessos de arroz vermelho com quatro marcadores SSR. SI, seleção independente. FG, fluxo gênico Porto Alegre, RS. 2010.

População	ID	Marcador molecular SSR				Mutação			Origem da resistência
		4797	RM341	RM251	RM475	G ₆₅₄ E	S ₆₅₃ N	A ₁₂₂ T	
Santa Maria 1	46	129/129	155/155	151/151	216/216	x			FG
Santa Maria 1	47	129/129	152/152	151/151	216/216	x			FG
Santa Maria 1	48	129/129	152/152	129/151	216/216	x			FG
Santa Maria 1	49	129/129	157/157	129/129	216/216	x			FG
Santa Maria 1	50	129/129	157/157	151/151	-/-	x			FG
Santa Maria 1	51	129/129	157/157	129/129	212/212	x			FG
Santa Maria 1	52	135/135	187/187	129/134	212/212	x			FG
Santa Maria 1	53	135/135	157/157	151/151	216/216	x			FG
Santa Maria 1	54	135/135	157/157	129/129	202/216	x			FG
Santa Maria 1	55	129/129	152/152	151/151	216/216	x			FG
Santa Maria 1	56	135/135	157/157	129/129	212/212	x		x	FG
Santa Maria 1	57	129/129	157/187	129/129	212/212	x			FG
Santa Maria 1	58	129/129	157/157	-/-	216/216	x			FG
Santa Maria 1	59	129/135	157/187	129/151	212/216	x			FG
Santa Maria 1	60	135/135	157/157	-/-	-/-	x			FG
Santa Maria 2	61	129/129	152/152	-/-	216/216	x			FG
Santa Maria 2	62	135/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
Santa Maria 2	63	135/135	157/157	129/134	212/212	x			FG
Santa Maria 2	64	135/135	157/157	129/134	212/212	x			FG
Santa Maria 2	65	129/129	157/157	129/129	216/216	x			FG
Santa Maria 2	66	129/129	152/152	129/129	-/-	x			FG
Santa Maria 2	67	129/129	157/157	134/151	212/212	x			FG
Santa Maria 2	68	135/135	152/152	129/129	-/-	x			FG
Santa Maria 2	69	135/135	157/157	151/151	-/-	x			FG
Santa Maria 2	70	129/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
Santa Maria 2	71	135/135	157/157	129/129	-/-	x			FG
Santa Maria 2	72	129/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
Santa Maria 2	73	129/135	157/187	129/129	212/216	x			FG
Santa Maria 2	74	129/129	157/157	129/129	212/212	x			FG
Restinga Seca	76	129/129	157/157	143/163	216/216		x		FG
Restinga Seca	77	129/129	187/187	129/134	212/212			x	FG
Restinga Seca	78	129/129	187/187	129/129	212/212			x	FG
Restinga Seca	79	129/129	187/187	129/129	212/212			x	FG
Restinga Seca	80	129/129	187/187	129/129	212/212			x	FG
Restinga Seca	81	129/129	157/187	143/143	202/202		x		FG
Restinga Seca	82	129/129	157/187	143/163	202/216		x		FG
Restinga Seca	83	129/129	187/187	129/129	212/212			x	FG
Restinga Seca	85	129/129	157/187	163/163	202/216		x		FG
Restinga Seca	86	129/129	157/187	143/143	216/216		x		FG
Restinga Seca	88	129/129	187/187	129/134	212/212			x	FG
Restinga Seca	89	129/129	187/187	129/129	212/212	x			FG
Restinga Seca	90	129/129	187/187	-/-	212/212			x	FG

continuação APÊNDICE 3. Genotipagem de 176 acessos de arroz vermelho com quatro marcadores SSR. SI, seleção independente. FG, fluxo gênico Porto Alegre, RS. 2010.

População	ID	Marcador molecular SSR				Mutação			Origem da resistência
		4797	RM341	RM251	RM475	G ₆₅₄ E	S ₆₅₃ N	A ₁₂₂ T	
São Gabriel	91	129/129	152/157	143/163	202/216		x		FG
São Gabriel	92	129/129	152/155	147/147	202/202		x		FG
São Gabriel	93	129/135	157/157	143/143	202/216		x		FG
São Gabriel	94	129/129	155/155	143/147	202/202		x		FG
São Gabriel	95	-/-	-/-	143/147	202/202		x		FG
São Gabriel	96	129/135	157/157	143/163	202/216		x		FG
São Gabriel	97	129/129	157/157	139/143	202/202		x		FG
São Gabriel	98	129/135	152/157	143/147	202/202		x		FG
São Gabriel	99	129/135	157/157	147/163	202/202		x		FG
São Gabriel	100	129/135	157/157	147/163	202/202		x		FG
São Gabriel	101	129/129	157/157	143/143	202/202		x		FG
São Gabriel	102	129/129	157/157	143/163	202/216		x		FG
Novos Cabrais	106	129/129	157/157	139/139	212/212	x			FG
Novos Cabrais	110	129/129	157/187	-/-	212/212	x		x	FG
Dona Francisca	182	129/129	187/187	139/139	212/212			x	FG
Dona Francisca	183	129/129	187/187	-/-	212/212			x	FG
Dona Francisca	184	129/129	187/187	-/-	212/212			x	FG
Dona Francisca	192	135/135	157/157	-/-	-/-		x	x	FG
Dona Francisca	195	129/129	157/157	-/-	-/-	x	x	x	FG
Rosário do Sul 1	197	135/135	157/157	163/163	212/212	x		x	FG
Rosário do Sul 1	204	129/129	157/157	129/129	-/-	x			FG
Rosário do Sul 1	205	135/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
Rosário do Sul 1	206	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG
Rosário do Sul 1	207	129/129	157/157	-/-	-/-	x			FG
Rosário do Sul 1	208	-/-	157/157	134/134	216/216	x			FG
Rosário do Sul 1	209	129/129	155/155	134/134	212/216	x			FG
Rosário do Sul 1	210	129/129	157/157	143/143	-/-	x			FG
Rosário do Sul 2	211	129/129	157/157	143/143	216/216	x			FG
Rosário do Sul 2	212	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG
Rosário do Sul 2	213	129/129	157/157	134/134	216/216	x			FG
Rosário do Sul 2	214	135/135	157/157	147/147	216/216	x			FG
Rosário do Sul 2	215	129/135	157/157	-/-	212/212	x			FG
Rosário do Sul 2	216	129/135	157/157	-/-	212/212	x			FG
Rosário do Sul 2	217	129/129	157/157	129/129	212/212	x			FG
Rosário do Sul 2	218	135/135	157/157	163/163	-/-	x			FG
Rosário do Sul 2	219	129/129	157/157	134/134	216/216	x			FG
Rosário do Sul 2	220	135/135	157/157	143/143	216/216	x			FG
Rosário do Sul 2	221	129/129	157/157	163/163	212/212	x			FG
Rosário do Sul 2	222	129/135	157/157	163/163	-/-	x			FG
Rosário do Sul 2	223	129/135	157/157	129/129	202/212	x			FG
Rosário do Sul 2	224	129/129	157/157	151/151	-/-	x			FG
Rosário do Sul 2	225	129/129	152/152	134/134	202/202	x			FG

continuação APÊNDICE 3. Genotipagem de 176 acessos de arroz vermelho com quatro marcadores SSR. SI, seleção independente. FG, fluxo gênico Porto Alegre, RS. 2010.

População	ID	Marcador molecular SSR				Mutação			Origem da resistência
		4797	RM341	RM251	RM475	G ₆₅₄ E	S ₆₅₃ N	A ₁₂₂ T	
Camaquã	226	129/129	152/157	134/134	202/212	x			FG
Camaquã	227	129/135	157/157	151/151	212/212	x			FG
Camaquã	228	129/129	157/157	129/151	212/212	x			FG
Camaquã	229	129/135	157/157	129/151	212/212	x			FG
Camaquã	230	129/135	157/157	129/151	212/212	x			FG
Camaquã	231	129/129	157/157	143/147	212/212	x			FG
Camaquã	232	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG
Camaquã	233	129/129	157/157	-/-	212/212	x			FG
Camaquã	234	129/129	157/157	134/134	216/216	x			FG
Camaquã	235	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG
Uruguaiiana	236	-/-	157/157	-/-	212/212	x			FG
Uruguaiiana	237	129/129	157/157	-/-	212/212	x	x		FG
Uruguaiiana	238	129/135	157/157	163/163	202/212	x			FG
Uruguaiiana	239	135/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
Uruguaiiana	240	135/135	157/157	129/129	-/-	x			FG
Uruguaiiana	241	135/135	157/157	-/-	212/212	x			FG
Uruguaiiana	242	135/135	157/157	143/143	212/212	x			FG
Uruguaiiana	243	129/129	157/157	-/-	-/-	x			FG
Uruguaiiana	244	135/135	157/157	129/129	212/212	x			FG
Uruguaiiana	245	135/135	157/157	151/151	212/212	x			FG
Uruguaiiana	246	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG
Uruguaiiana	247	135/135	157/157	134/134	212/212	x			FG
Uruguaiiana	248	129/135	157/157	134/134	212/212	x			FG
Uruguaiiana	249	129/129	157/157	-/-	212/212	x			FG
Uruguaiiana	250	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG
Agudo	251	129/129	157/157	-/-	212/212	x			FG
Agudo	252	-/-	157/157	134/134	216/216	x			FG
Agudo	253	135/135	157/157	-/-	-/-	x			FG
Agudo	254	129/129	157/157	-/-	-/-	x			FG
Agudo	255	129/129	187/187	-/-	202/202	x			FG
Agudo	256	129/129	157/157	-/-	-/-	x			FG
Agudo	257	135/135	157/157	-/-	216/216	x			FG
Agudo	258	135/135	157/157	-/-	216/216	x			FG
Agudo	259	135/135	157/157	-/-	212/212	x			FG
Agudo	260	129/129	157/157	-/-	202/202	x			FG
Agudo	261	135/135	157/157	134/134	202/202	x			FG
Agudo	262	135/135	157/157	134/134	202/216	x			FG
Agudo	263	129/129	157/157	-/-	-/-	x			FG
Agudo	264	129/129	187/187	-/-	-/-	x			FG
Agudo	265	135/135	157/157	143/143	212/212	x			FG
Alegrete	266	129/135	157/187	-/-	212/212	x			FG
Alegrete	267	129/135	157/187	134/134	212/212	x			FG
Alegrete	268	-/-	157/187	134/134	212/212	x			FG
Alegrete	269	129/129	157/157	134/134	212/212	x			FG

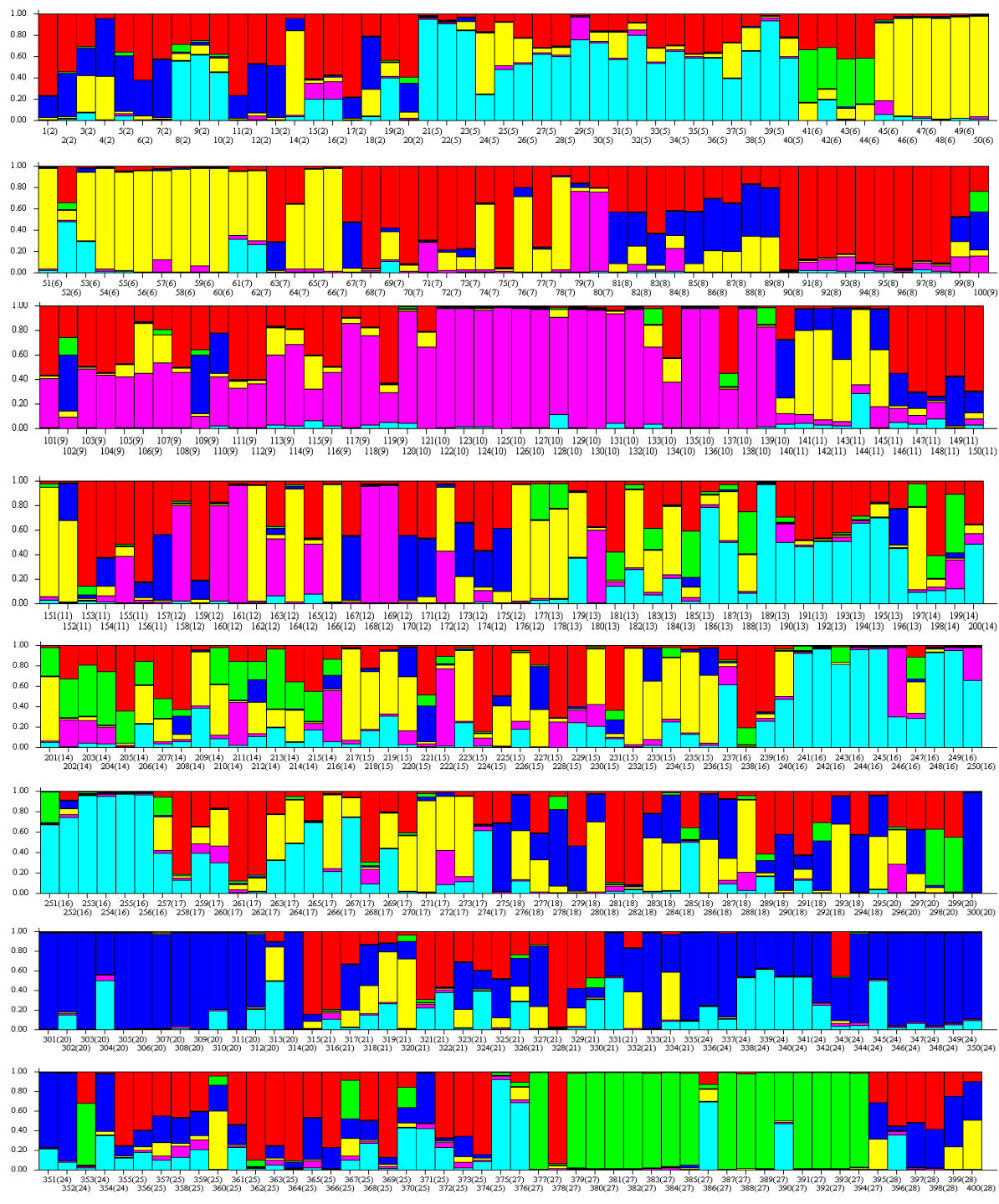
continuação APÊNDICE 3. Genotipagem de 176 acessos de arroz vermelho com quatro marcadores SSR. SI, seleção independente. FG, fluxo gênico Porto Alegre, RS. 2010.

População	ID	Marcador molecular SSR				Mutação			Origem da resistência
		4797	RM341	RM251	RM475	G ₆₅₄ E	S ₆₅₃ N	A ₁₂₂ T	
Alegrete	270	129/129	157/157	143/143	216/216	x			FG
Alegrete	271	129/129	157/157	143/143	-/-	x			FG
Alegrete	272	135/135	157/157	147/147	-/-	x			FG
Alegrete	273	129/129	152/157	143/143	-/-	x			FG
Alegrete	274	135/135	157/157	143/143	212/212	x			FG
Alegrete	275	135/135	157/157	143/143	-/-	x			FG

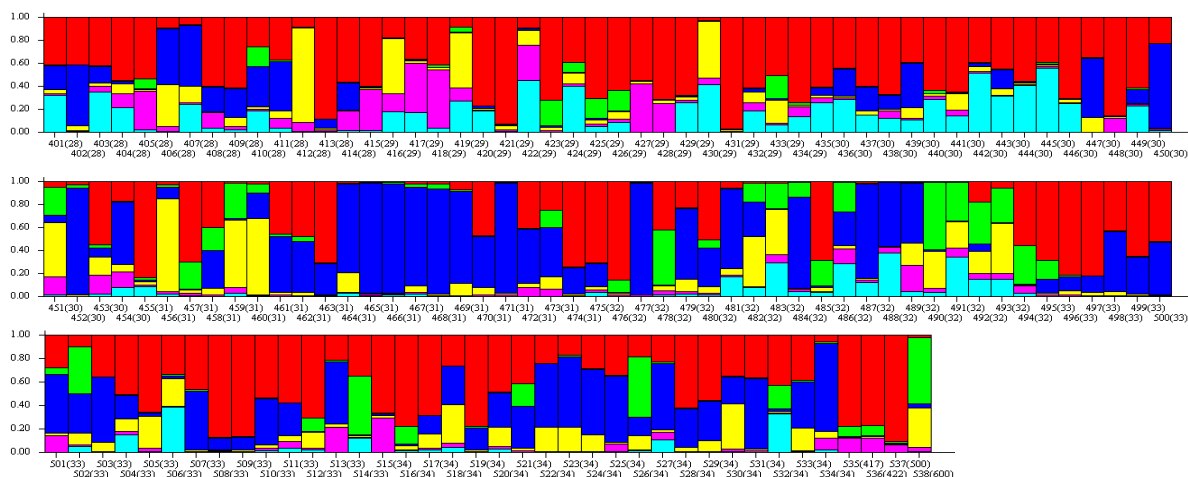
APÊNDICE 4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos 24 marcadores SSR utilizados para genotipagem das populações de arroz vermelho, testado pelos testes Qui-quadrado (X^2), *Likelihood Ratio Test* (LRT) e Teste exato de Fischer. Porto Alegre, RS. 2010.

SSR	Valor X^2	Graus de Liberdade X^2	Valor-p X^2	Valor LRT	Graus de Liberdade LRT	Valor-p LRT	Valor-p Exato
4653	1295,98	36,00	0,00	692,60	36,00	0,00	0,00
OG106	3407,09	78,00	0,00	1106,04	78,00	0,00	0,00
RM103	1357,34	10,00	0,00	355,67	10,00	0,00	0,00
RM204	2285,55	36,00	0,00	465,68	36,00	0,00	0,00
RM257	3764,85	120,00	0,00	712,98	120,00	0,00	0,00
RM38	2220,80	28,00	0,00	605,54	28,00	0,00	0,00
OG44	742,50	21,00	0,00	62,27	21,00	0,00	0,00
RM171	1321,61	21,00	0,00	466,53	21,00	0,00	0,00
RM229	1145,94	21,00	0,00	599,91	21,00	0,00	0,00
RM231	917,89	15,00	0,00	601,88	15,00	0,00	0,00
RM287	2317,65	36,00	0,00	997,16	36,00	0,00	0,00
RM7	977,18	15,00	0,00	396,60	15,00	0,00	0,00
OG10	3922,76	78,00	0,00	1385,30	78,00	0,00	0,00
RM14	6686,47	171,00	0,00	1528,26	171,00	0,00	0,00
RM210	4033,73	66,00	0,00	1226,79	66,00	0,00	0,00
RM222	3467,20	36,00	0,00	1138,91	36,00	0,00	0,00
RM253	3533,75	55,00	0,00	1141,92	55,00	0,00	0,00
RM309	764,62	3,00	0,00	719,49	3,00	0,00	0,00
RM11	4872,13	120,00	0,00	838,56	120,00	0,00	0,00
RM207	5064,16	120,00	0,00	1161,64	120,00	0,00	0,00
RM248	4682,63	136,00	0,00	984,30	136,00	0,00	0,00
RM252	9832,19	378,00	0,00	1852,71	378,00	0,00	0,00
RM263	4396,70	55,00	0,00	1078,20	55,00	0,00	0,00
RM55	4936,39	66,00	0,00	939,83	66,00	0,00	0,00

APÊNDICE 5. Composição genética de 533 indivíduos de arroz vermelho e quatro cultivares de arroz do Rio Grande do Sul, agrupados em seis grupos (K=6), baseado em 24 marcadores SSR. As cores referentes a cada grupo são vermelho=K1, verde=K2, azul=K3, amarelo=K4, rosa=K5 e ciano=K6. Cada indivíduo é representado por uma coluna e as cores representam a contribuição de cada grupo K definido. Acima, os indivíduos estão ordenados por grupo de maior contribuição. Abaixo, a ordenação é baseada nas populações amostradas conforme numeração da Figura 16. As cultivares IRGA 417 (417), IRGA 422 CL (422), PUITÁ INTA CL (500) foram locadas no grupo K1 e Sator CL no grupo K2 (600). Porto Alegre, RS, 2010.



continuação APÊNDICE 5. Composição genética de 533 indivíduos de arroz vermelho e quatro cultivares de arroz do Rio Grande do Sul, agrupados em seis grupos (K=6), baseado em 24 marcadores SSR. As cores referentes a cada grupo são vermelho=K1, verde=K2, azul=K3, amarelo=K4, rosa=K5 e ciano=K6. Cada indivíduo é representado por uma coluna e as cores representam a contribuição de cada grupo K definido. Acima, os indivíduos estão ordenados por grupo de maior contribuição. Abaixo, a ordenação é baseada nas populações amostradas conforme numeração da Figura 16. As cultivares IRGA 417 (417), IRGA 422 CL (422), PUITÁ INTA CL (500) foram locadas no grupo K1 e Sator CL no grupo K2 (600). Porto Alegre, RS, 2010.



APÊNDICE 6. Análises de variância da germinação acumulada de cultivares de arroz em 16 épocas de avaliação em 20 e 25°C. Porto Alegre, RS. 2010.

A) Avaliações em 20°C

Avaliação 24h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	0,144	1,941	0,177
Lote	4	0,074	1,000	0,445
cultivar * lote	12	0,074	1,630	0,100
Erro	80	0,046		

Avaliação 33h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	0,343	1,664	0,227
Lote	4	0,268	1,299	0,325
cultivar * lote	12	0,206	2,580	0,006
Erro	80	0,080		

Avaliação 48h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	8,214	3,864	0,038
Lote	4	5,961	2,804	0,074
cultivar * lote	12	2,126	1,875	0,050
Erro	80	1,134		

Avaliação 54h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	358,829	2,010	0,166
Lote	4	563,417	3,156	0,055
cultivar * lote	12	178,544	9,909	0,000
Erro	80	18,019		

Avaliação 72h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	978,631	1,916	0,181
Lote	4	1170,411	2,291	0,120
cultivar * lote	12	510,826	14,175	0,000
Erro	80	36,037		

Avaliação 81h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	6659,064	6,109	0,009
Lote	4	941,481	0,864	0,513
cultivar * lote	12	1089,996	14,865	0,000
Erro	80	73,327		

Avaliação 96h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	6855,029	4,802	0,020
Lote	4	776,134	0,544	0,707
cultivar * lote	12	1427,680	14,381	0,000
Erro	80	99,279		

Avaliação 105h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	6263,803	6,934	0,006
Lote	4	594,485	0,658	0,633
cultivar * lote	12	903,301	10,923	0,000
Erro	80	82,697		

continuação APÊNDICE 6. Análises de variância da germinação acumulada de cultivares de arroz em 16 épocas de avaliação em 20 e 25°C. Porto Alegre, RS. 2010.

Avaliação 120h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	6768,830	8,398	0,003
Lote	4	363,492	0,451	0,770
cultivar * lote	12	806,023	17,478	0,000
Erro	80	46,117		

Avaliação 129h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	3186,884	6,780	0,006
Lote	4	94,495	0,201	0,933
cultivar * lote	12	470,011	13,183	0,000
Erro	80	35,653		

Avaliação 144h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	1676,032	6,562	0,007
Lote	4	109,675	0,429	0,785
cultivar * lote	12	255,431	16,277	0,000
Erro	80	15,692		

Avaliação 153h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	302,461	5,711	0,012
Lote	4	15,702	0,296	0,875
cultivar * lote	12	52,964	10,295	0,000
Erro	80	5,145		

Avaliação 177h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	36,271	2,484	0,111
Lote	4	24,650	1,688	0,217
cultivar * lote	12	14,604	15,092	0,000
Erro	80	0,968		

Avaliação 201h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	1,690	2,601	0,100
Lote	4	0,650	1,000	0,445
cultivar * lote	12	0,650	4,330	0,000
Erro	80	0,150		

Avaliação 225h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	0,144	2,058	0,159
Lote	4	0,070	1,000	0,445
cultivar * lote	12	0,070	2,863	0,003
Erro	80	0,024		

Avaliação 249h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	0,000	.	.
Lote	4	0,000	.	.
cultivar * lote	12	0,000	.	.
Erro	80	0,000		

continuação APÊNDICE 6. Análises de variância da germinação acumulada de cultivares de arroz em 16 épocas de avaliação em 20 e 25°C. Porto Alegre, RS. 2010.

B) Avaliações em 25°C:

Avaliação 24h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	52,454	3,373	0,055
Lote	4	17,429	1,121	0,392
cultivar * lote	12	15,550	8,569	0,000
Erro	80	1,815		

Avaliação 33h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	2465,530	14,895	0,000
Lote	4	218,116	1,318	0,319
cultivar * lote	12	165,533	18,921	0,000
Erro	80	8,748		

Avaliação 48h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	34545,531	94,825	0,000
Lote	4	996,295	2,735	0,079
cultivar * lote	12	364,310	18,428	0,000
Erro	80	19,769		

Avaliação 57h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	21694,099	16,929	0,000
Lote	4	2900,455	2,263	0,123
cultivar * lote	12	1281,455	20,937	0,000
Erro	80	61,206		

Avaliação 72h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	13762,764	9,637	0,002
Lote	4	3635,694	2,546	0,094
cultivar * lote	12	1428,132	21,706	0,000
Erro	80	65,794		

Avaliação 81h				
Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	4817,712	6,783	0,006
Lote	4	1691,853	2,382	0,110
cultivar * lote	12	710,274	21,640	0,000
Erro	80	32,822		

continuação APÊNDICE 6. Análises de variância da germinação acumulada de cultivares de arroz em 16 épocas de avaliação em 20 e 25°C. Porto Alegre, RS. 2010.

Avaliação 96h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	2231,891	4,606	0,023
Lote	4	869,512	1,794	0,195
cultivar * lote	12	484,586	21,326	0,000
Erro	80	22,723		

Avaliação 105h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	633,197	4,268	0,029
Lote	4	180,967	1,220	0,353
cultivar * lote	12	148,357	9,000	0,000
Erro	80	16,484		

Avaliação 120h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	335,255	3,636	0,045
Lote	4	111,638	1,211	0,356
cultivar * lote	12	92,206	5,780	0,000
Erro	80	15,952		

Avaliação 129h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	137,539	3,494	0,050
Lote	4	56,160	1,427	0,284
cultivar * lote	12	39,369	8,719	0,000
Erro	80	4,515		

Avaliação 144h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	57,422	2,343	0,125
Lote	4	31,940	1,303	0,323
cultivar * lote	12	24,513	9,183	0,000
Erro	80	2,669		

Avaliação 153h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	13,945	1,838	0,194
Lote	4	10,495	1,383	0,297
cultivar * lote	12	7,588	6,760	0,000
Erro	80	1,122		

continuação APÊNDICE 6. Análises de variância da germinação acumulada de cultivares de arroz em 16 épocas de avaliação em 20 e 25°C. Porto Alegre, RS. 2010.

Avaliação 177h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	0,000	.	.
Lote	4	0,000	.	.
cultivar * lote	12	0,000	.	.
Erro	80	0,000		

Avaliação 201h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	0,000	.	.
Lote	4	0,000	.	.
cultivar * lote	12	0,000	.	.
Erro	80	0,000		

Avaliação 225h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	0,000	.	.
Lote	4	0,000	.	.
cultivar * lote	12	0,000	.	.
Erro	80	0,000		

Avaliação 249h

Fonte da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Significância
Cultivar	3	0,000	.	.
Lote	4	0,000	.	.
cultivar * lote	12	0,000	.	.
Erro	80	0,000		

8 VITA

Ives Clayton Gomes do Reis Goulart é filho de João Clézio Lopes Goulart e Maria das Graças Gomes dos Reis. Nasceu em Mauá/SP em 02 de agosto de 1982. Em 1992 mudou-se para Canoas/RS onde completou o ensino fundamental no Colégio Estadual Marechal Rondon. Em 2000, completou o ensino médio na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio José Gomes de Vasconcelos Jardim. Em 2003, mudou-se para Porto Alegre e ingressou no curso de Agronomia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde se graduou Engenheiro Agrônomo em 2008. De 2003 a 2007, foi bolsista de Iniciação Científica (IC) na área de Herbologia sob orientação do Prof. Ph.D. Ribas Antônio Vidal. Entre 2007 e 2008 foi bolsista voluntário na área de Herbologia sob orientação do Prof. Ph.D. Aldo Merotto Junior. Neste mesmo período, foi bolsista de IC do Instituto Rio Grandense do Arroz sob orientação dos pesquisadores Dr. Gustavo Rodrigo Daltrozo Funck e M.Sc. Daniel Santos Grohs na área de Fitopatologia. Entre 2008 e 2009 foi bolsista de Apoio Técnico no Programa de Melhoramento de Aveia da UFRGS, sob coordenação dos Prof. Ph.D. Luiz Carlos Federizzi e Ph.D. Marcelo Teixeira Pacheco. Em todo o período como bolsista de IC e AT teve bolsa de estudos financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em 2009, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS, em Porto Alegre/RS, também com apoio financeiro do CNPq.