Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Análise da estrutura genética de populações e sistema reprodutivo de *Oryza
glumaepatula* por meio de microssatélites**

Marines Marli Gniech Karasawa

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba

2005

Marines Marli Gniech Karasawa
Engenheiro Agrônomo

**Análise da estrutura genética de populações e sistema reprodutivo de *Oryza glumaepatula*
por meio de microssatélites**

Orientadora:

Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey

Co-orientador:

Prof. Dr. Roland Vencovsky

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento
de plantas

Piracicaba

2005

Ao meu esposo Shiguekazu Karasawa
À minha filha Eliane pela cooperação
Aos meus pais e irmãos pelo incentivo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial:

À Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Ann Veasey pelos ensinamentos, orientação e auxílios prestados;

Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky, pelos sábios conselhos fornecidos durante a orientação, pela amizade, pelo incentivo e, sobretudo, pela humildade no repasse de seus conhecimentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP, pela oportunidade deste aperfeiçoamento;

Ao CNPq pelo suporte financeiro;

Ao professor Dr. Giancarlo pela supervisão dos estágios em Genética Geral e Biologia Celular e pelas contribuições fornecidas durante todo o desenvolvimento da Tese;

Aos Prof(es): Dr^ª. Maria Lúcia Carneiro Vieira, Dr^ª. Margarida de Aguiar Perecin, Dr. Akihiko Ando, Dr^ª Mônica Labate e Dr. Carlos Alberto Labate pelos aconselhamentos e auxílios prestados sempre que necessário;

À Dr^ª. Maria Imaculada Zucchi, pela amizade, pelo incentivo e auxílio nos softwares de análises estatísticas;

As alunas da graduação Cynthia e Mariana que estiveram comigo durante o desenvolvimento da minha tese;

Aos estimados colegas da Esalq: Priscila, Paola, Alexander, Millor, Farias, Paulo, Sayuri, Maria Rita, Marcos, Michel, Hannay, Éder, Karina, Carolina, Eulália, Vanderlei, Márcia, Monalisa e Luciana pelo convívio e amizade;

Aos funcionários: Amaral, Carlinhos, Rafael, Salete, Silvana, Kátia, Eliana, Glória, Fernando, Léia, Neusa, Maídia, Macedônio, Silvia, Carlos, Valdir, Vitor e Berdã pelo auxílio, convívio e amizade.

Aos demais colegas e amigos de pós-graduação e graduação, professores e funcionários do Departamento de Genética, pelos ensinamentos, convívio e amizade;

Ao meu esposo Shiguekazu Karasawa e a minha filha Eliane Gniech Karasawa pelo apoio e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos prof(es) Ricardo Antunes Azevedo, Márcio Castro pela disponibilidade dos equipamentos dos laboratórios sempre que necessário;

Às demais pessoas que, de alguma forma, contribuíram neste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Revisão de literatura	12
1.1.1 Origem do gênero <i>Oryza</i> e sua taxonomia	12
1.1.2 Distribuição geográfica, características morfológicas e aspectos ecológicos das espécies brasileiras de arroz selvagem	16
1.1.3 Sistemas reprodutivos em <i>Oryza</i> , frequências em angiospermas e implicações.....	18
1.1.4 Diversidade genética em populações de plantas.....	23
1.1.5 Uso de marcadores microssatélites.....	27
Referências	33
2 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE <i>Oryza glumaepatula</i> STEUD. DETECTADAS POR MARCADORES DE MICROSSATÉLITES	40
Resumo	40
Abstract.....	41
2.1 Introdução.....	42
2.2 Desenvolvimento	42
2.2.1 Revisão de literatura	42
2.2.2 Material e métodos	45
2.2.2.1 Populações, Amostragem e Extração de DNA.....	45
2.2.2.2 Amplificação dos locos SSR	48
2.2.2.3 Análise estatística dos dados	50
2.2.3 Resultados.....	53
2.2.4 Discussão	57

	6
2.2.4.1 Variação genética	57
2.2.4.2 Estrutura genética das populações	59
2.2.4.3 Considerações sobre a conservação.....	63
2.3 Conclusões.....	64
Referências	65
3 SISTEMA REPRODUTIVO DAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE <i>Oryza glumaepatula</i> STEUD. DETECTADAS POR MARCADORES DE MICROSSATÉLITES	70
Resumo	70
Abstract.....	71
3.1 Introdução	72
3.2 Desenvolvimento	72
3.2.1 Revisão de literatura	72
3.2.2 Material e métodos	75
3.2.2.1 Material vegetal	75
3.2.2.2 Análise por microssatélites.....	77
3.2.2.3 Análise estatística dos dados	80
3.2.3 Resultados.....	81
3.2.4 Discussão	84
3.3 Conclusões.....	87
Referências	88

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E SISTEMA REPRODUTIVO DE *Oryza glumaepatula* STEUD. POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO

As informações existentes em torno da estrutura genética e do sistema reprodutivo das populações de *Oryza glumaepatula* são poucas e ainda precárias. Este estudo teve como objetivo caracterizar a estrutura genética de 11 populações provenientes dos Rios Japurá, Solimões, Purus, Negro, Xingú e Tapajós (provenientes da bacia Amazônica) e dos Rios Paraguai e Taquari (provenientes da bacia do Paraguai) amostrando-se 30 indivíduos por população e avaliar o sistema reprodutivo em três dessas populações (SO-6, XI-1 e PG-1) a partir de 10 progênies maternas, com 10 plantas por progênie, em cada população. O DNA dos indivíduos foi extraído, quantificado e avaliado com base em oito locos de microssatélites e uma média de 10 alelos/loco. Estimaram-se parâmetros de diversidade genética, as estatísticas F e o fluxo gênico, verificando-se a existência de estruturação espacial, por meio do coeficiente de correlação de Pearson (r), e teste de Mantel. O sistema reprodutivo foi avaliado pela taxa de cruzamento aparente (nas populações) e pela taxa multilocos para as famílias das três populações. Obtiveram-se as seguintes estimativas de parâmetros genéticos: 77,3% de locos polimórficos; H_o (heterozigosidade observada média) = 0,091; H_e (diversidade gênica) = 0,393; $F_{ST} = 0,491$ (e $R_{ST} = 0,608$); $F_{IS} = 0,780$ e $F_{IT} = 0,888$. Nenhuma população foi encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A taxa média de cruzamento aparente foi de $\bar{t}_a = 0,124$ sugerindo sistema misto de reprodução com tendência a autogamia. Uma exceção foi a população do Rio Xingu (XI-1) que apresentou menos autogamia com $t_a = 0,454$, $H_o = 0,233$, $H_e = 0,369$ e o mais baixo índice de fixação $f = 0,371$. Os resultados indicam haver grande diversidade genética entre as populações bem como níveis variáveis de autofecundação natural. As populações não se encontraram estruturadas no espaço, pois foi nula a correlação entre distâncias genéticas e geográficas ($r = 0,03$). O estudo do sistema reprodutivo foi baseado num número médio menor de alelos por loco e forneceu as seguintes estimativas para as três populações (XI-1, SO-6 e PG-1), respectivamente: número médio de alelos por loco: 3, 3 e 5; endogamia das plantas-mãe ($\hat{F}_m$): 0,399, 0,846 e 0,631; taxas de cruzamentos multiloco ($\hat{t}_m$): 0,160, 0,011 e 0,223; uniloco ($\hat{t}_s$): 0,078, 0,003 e 0,100; cruzamento biparental ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$): 0,083, 0,008 e 0,123; coeficiente de coancestria (θ_{fam}): 0,711, 0,846 e 0,748. Os resultados confirmam a desuniformidade no sistema reprodutivo das populações, que variou de autogamia absoluta até taxas de cruzamento de 22,3%. Essa desuniformidade bem como a alta diversidade genética interpopulacional e a ausência de estruturação espacial indicam que atividades de conservação devem abranger o maior número possível de populações.

Palavras-chave: marcadores moleculares, arroz selvagem, estrutura genética, diversidade genética, sistema reprodutivo.

GENETIC STRUCTURE AND MATING SYSTEM OF *Oryza glumaepatula* STEUD. POPULATIONS USING MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

Information about genetic structure and breeding systems are little and poorly known of natural *O. glumaepatula* populations. The objective of this study was the characterization of the genetic structure of 11 populations from Japura, Solimões, Purus, Negro, Xingu and Tapajós rivers (from Amazon Hydrographic Basin) and from Paraguai and Taquari rivers (from Paraguai Hydrographic Basin), sampling 30 individuals per population and analysis of breeding system of three populations SO-6, XI-1 and PG-1, from 10 mother progeny with 10 plants per progeny in each population. Individual DNA was extracted, quantified and analyzed utilizing eight microsatellite loci with a mean of 10 alleles per loci. Genetic diversity parameters, Wright's F-statistics and gene flow were estimated. Space structure was also verified using Pearson's correlation coefficient (r) and Mantel's test. The breeding system was examined by the apparent outcrossing rate (in the populations) and multilocus outcrossing rate obtained for the progenies of three populations. The following estimates of parameters were obtained: 77.3% polymorphic loci; H_o (observed heterozygosity) = 0.091; H_e (diversidade gênica) = 0.393; F_{ST} = 0.491 (e R_{ST} = 0.608); F_{IS} = 0.780 e F_{IT} = 0.888. Neither population was in Hardy-Weinberg equilibrium. The average of apparent outcrossing rate was $\bar{t}_a = 0.124$, suggesting mixed mating system with predominance of inbreeding. One exception was the Xingu's river population (XI-1), which has presented the lowest autogamy indices with $t_a = 0.459$, $H_o = 0.233$, $H_e = 0.369$, and the lowest fixation index $f = 0.371$. These results pointed for a high genetic diversity between populations also variable natural inbreeding degrees. These populations were not structured on space, because there were null the correlations between genetic and geographic distances ($r = 0.003$). The study of breeding system was based on lowest average alleles number per loci and to provide the following estimates for the three populations (XI-1, SO-6 e PG-1) respectively: average number of alleles per loci: 3, 3 and 5; maternal inbreeding ($\hat{F}_m$): 0.399, 0.846 and 0.631; multilocus outcrossing rate ($\hat{t}_m$): 0.160, 0.011 and 0.223; single-locus ($\hat{t}_s$): 0.078, 0.003 and 0.100; biparental inbreeding ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$): 0.083, 0.008 and 0.123; coancestry coefficient (θ_{fam}): 0.711, 0.846 and 0.748. These results confirm the population desuniform mating system, which had varied from perfect autogamy to 22.3% of outcrossing rates. That desuniformity as well as the high interpopulation genetic diversity and the absence of space structuring indicate that conservation activities should include the largest possible number of populations.

Keywords: molecular markers, wild rice, genetic structure, genetic diversity, breeding systems.

1 INTRODUÇÃO

O processo evolutivo e de domesticação do arroz fez surgir inúmeros tipos divergentes geneticamente adaptados às mais variadas condições agro-ecológicas, fazendo com que o arroz seja um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. Pertencente ao gênero *Oryza*, o arroz apresenta apenas duas espécies cultivadas e 21 espécies selvagens (KHUSH, 1997).

As duas espécies cultivadas de arroz são *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* Steud (GRIST, 1975; OKA, 1988). A primeira, originária da Ásia, tornou-se amplamente distribuída por todas as regiões tropicais e temperadas do mundo, igualando-se ao trigo como alimento básico, e a segunda é circunscrita à África Ocidental e a sua cultura está sendo paulatinamente substituída pelo arroz asiático, que é *O. sativa* (RANGEL, 1998).

As espécies selvagens de arroz estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia (dez espécies), África (cinco espécies), América Central e do Sul (quatro espécies) e na Austrália (duas espécies) (GRIST, 1975; OLIVEIRA, 1991). No Brasil, são encontradas todas as quatro espécies distribuídas na América Central e América do Sul. Dentre elas encontram-se as espécies *O. glumaepatula*, que é diplóide ($2n = 24$, genoma $A^{sp}A^{sp}$), *O. alta*, *O. grandiglumis* e *O. latifolia*, que são tetraplóides ($2n = 48$, genoma CCDD) (ANDO, 1998). Estas espécies selvagens representam um importante reservatório gênico para o melhoramento do arroz cultivado. No caso das espécies asiáticas, essas já estão sendo utilizadas como fontes de resistência no combate a pragas e doenças (BRAR; KHUSH, 1997).

O. glumaepatula é encontrada em várias partes da América Latina desde 23°N em Cuba até 23°S no Brasil (VAUGHAN; MORISHIMA; KUDOWAKI, 2003). No Brasil, as populações de *O. glumaepatula* são encontradas na região Amazônica, no Pantanal Matogrossense e em rios menores dos Estados de Goiás, Tocantins e Roraima (OLIVEIRA, 1993; OLIVEIRA, 1994; BRONDANI et al., 2002). Para estudar a estrutura e a diversidade genética presente em populações de *O. glumaepatula* Akimoto; Shimamoto e Morishima (1998) utilizaram marcadores de isoenzimas e Buso, Rangel e Ferreira (1998b) utilizaram marcadores de isoenzimas e RAPD. Nestes estudos os autores supra citados verificaram elevado nível de diferenciação entre as populações e concluíram que pelo padrão de distribuição da variação genética a espécie apresentava sistema reprodutivo de autofecundação. Também Brondani et al. (2002) utilizando marcadores moleculares microssatélites também encontrou níveis baixos de diversidade e elevada endogamia, contudo a estimativa da taxa de cruzamento aparente (t_a) acusou 18,8% de

cruzamentos. Logo, o sistema reprodutivo deveria ser considerado misto com predomínio de autofecundação, pois de acordo com as convenções uma espécie deve ser considerada mista sempre que apresentar mais de 5% e menos de 95% de cruzamentos. Diante destas informações, verificou-se a necessidade do conhecimento da estrutura genética das coleções de populações armazenadas no banco de germoplasma do Departamento de Genética e da confirmação do sistema reprodutivo se é autógamo ou misto com predomínio de autogamia. Sabe-se que a estrutura genética das populações é bastante influenciada pelo tipo de sistema reprodutivo, porque é ele quem determina a frequência dos genótipos nos indivíduos das futuras gerações (HAMRICK, 1979; BROWN, 1990).

Nos programas de preservação *in situ* devem ser levadas em consideração as características genéticas e demográficas das espécies, porque estas características implicam na possibilidade de evolução contínua, e desenvolvimento de novas estratégias adaptativas. Dentre os diversos fatores microevolutivos, o fluxo gênico torna-se importante pelas suas implicações sobre a estrutura genética das populações, pois condiciona a natureza e o nível de variabilidade das populações (MARTINS, 1987). De acordo com Frankel, Brown e Burdon (1998) os maiores determinantes da diversidade genética em plantas terrestres são a soma da variação das forças ecológicas abióticas (clima, localização e solo), das interações bióticas (simbiose, parasitismo e predação) e das características da espécie (tamanho da população, sistema reprodutivo, mutação, migração e dispersão). Todas estas três classes de fatores influenciam a composição genética da população de forma estocástica e direção através da seleção natural ou eventos aleatórios.

Devido a pouca confiabilidade na taxa de polimorfismo dos marcadores isoenzimáticos em função de alterações sofridas, pelo ambiente e estado vegetativo, entre outros (SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001) e do baixo número de marcadores geralmente observado (VEASEY, 2001), utilizaram-se marcadores moleculares microsatélites, que têm sido altamente indicados para estudos de populações naturais pela sua reprodutibilidade (GRATTAPAGLIA, 1998), por serem mais informativos (BRONDANI et al., 2002), possuírem ocorrência elevada e amplamente distribuídos no genoma (TANKSLEY, 1993) e por serem considerados geneticamente neutros, para a caracterização das populações em geral.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Caracterizar com marcadores moleculares de microssatélites 11 populações de *Oryza glumaepatula*, provenientes de diferentes bacias hidrográficas do Brasil e Paraguai, visando ao estudo da estrutura genética dessas populações.
2. Estimar a taxa de cruzamento de três populações de *Oryza glumaepatula*, PG – 1, SO – 6 e XI, provenientes das bacias hidrográficas dos Rios Paraguai, Solimões e Xingú, respectivamente, visando determinar o sistema reprodutivo usando marcadores moleculares de microssatélites.

Hipóteses

Este trabalho teve as seguintes hipóteses:

1. A estrutura genética é mais diversa entre as populações e entre regiões do que dentro de populações.
2. Existe correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas para as populações em estudo.
3. As populações de *Oryza glumaepatula* apresentam sistema reprodutivo de autofecundação.

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 Origem do gênero *Oryza* e sua taxonomia

O arroz é uma das plantas alimentícias mais antigas, e é quase impossível determinar com exatidão a época em que o homem começou a cultivá-la. Fatos históricos indicam o cultivo de 9000 anos A.C. (KHUSH, 1997). De acordo com Grist (1975) as duas espécies cultivadas de arroz são *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* Steud. *O. sativa* originária da Ásia, tornou-se amplamente distribuída por todas as regiões tropicais e temperadas do mundo, igualando-se ao trigo como alimento básico, a segunda é circunscrita à África Ocidental e a sua cultura está sendo paulatinamente substituída pelo arroz asiático (RANGEL, 1998).

A domesticação do arroz resultou no desenvolvimento de plantas anuais em diferentes elevações no leste da Índia, norte e sudeste da Ásia e oeste da China e foi iniciado pela alternância de seca e variações na temperatura durante o período *Neolítico*. Sedimentos, da província de Henan, China, foram datados entre 8942 a 7801 anos atrás e considerados como sendo os materiais mais antigos que evidenciam o cultivo do arroz no mundo (CHEN et al., 1997). Na Ásia a domesticação pode ter ocorrido independentemente e ao mesmo tempo que em outros locais do cinturão costeiro, prolongamento do leste da cordilheira do Himalaia na Índia, acima de Myanmar, norte da Tailândia, Laos e Vietnã, para o sudoeste ou sul da China. Nestas regiões o arroz cresceu em campos de cultivo inconstante. Na China, a planta cultivada crescia depois do plantio da semente em solos secos, sendo depois transplantado para local mal drenado (brejos). Este sistema de manejo fez com que o arroz fosse domesticado. No sudeste da Ásia, o arroz foi produzido em condições de seca e com altitudes elevadas, e só mais recentemente ele ocupou o "delta" do rio. Evidências lingüísticas mostram que a origem do cultivo do arroz se iniciou na região asiática. A primeira e a mais convincente evidência arqueológica da domesticação do arroz foi encontrada em 1966 por Welhelm G. Solheim II. Ele encontrou potes de barro cheios de grãos e palha de *O. sativa* na Tailândia, que foram datados de 4000 A.C. Na Índia, região de cultivo mais antigo do arroz, amostras de escavações mais antigas foram encontradas em Mohenjodaro e também no Paquistão datadas em torno de 2500 anos A.C. Na Índia, foi encontrado um dos grãos mais antigos carbonizado que foi datado em torno de 6500 anos A.C. Na China, a antiguidade do cultivo do arroz tem sido objeto de longo debate, sendo os mais antigos remanescentes de arroz

cultivado, datados de 7040 e 6960 anos A.C, encontrados em grãos carbonizados no território Tongxieng, província de Zhejiang, e no território de Yuyiau da província de Zhejiang, respectivamente. Zhao et al. (2000) reclassificando 782 grãos ancestrais de 8000 A.C., provenientes do sítio de Bashidan da província de Hunan, China, verificaram ampla variação nos materiais e constataram que estes estavam mais próximos do grupo *indica*, indicando transição evolutiva no ancestral. Chen et al. (1997) avaliando escavações da província de Henan, China, observaram materiais com aproximadamente 8000 A.C. e que estes mostravam ampla distribuição por todo o território central da China.

A espécie *O. glaberrima* parece ser originária da região central do delta do Níger. Deste núcleo primário, as raças desta espécie expandiram-se por todo o continente africano, de Cabo Verde ao Chad, por toda a área ocupada por seu antecessor direto *O. breviligulata*. Um centro secundário de diversificação parece ter se situado em Alta Gambia e Casamanza, de onde a técnica de cultivo de arroz era mais evoluída. O cultivo do arroz nigeriano provavelmente começou em torno de 1500 anos A.C., que é posterior ao cultivo do arroz asiático e se estendeu desde o Senegal até o Níger e de Mali até a região do Tombuctu (ANGLADETTE, 1969; KHUSH, 1997). Ambas as espécies são consideradas um exemplo de evolução paralela nas plantas cultivadas. O progenitor selvagem de *O. sativa* é o arroz comum da Ásia, *O. rufipogon*, que mostra uma grande variação de perene a anual. Tipos anuais recebem o nome específico de *O. nivara* e quando domesticados são chamados de *O. sativa*. Num caminho evolucionário paralelo, *O. glaberrima* foi domesticada da espécie anual *O. breviligulata* que derivou de uma forma perene (*O. longistaminata*) (Figura 1).

Figura 1 - Caminho evolutivo das espécies cultivadas do gênero *Oryza* (KHUSH, 1997; WATANABE, 1997)

O. rufipogon é distribuída do Paquistão até a China e Indonésia e suas populações variam de tipos perenes a anuais, que diferem marcadamente dos caracteres morfológicos. Em poucos grupos perenes a taxa de autofecundação é alta e a produtividade de sementes é menor que nos tipos anuais. Na Ásia, os tipos perenes crescem nas encostas dos campos cultivados e se cruzam naturalmente entre si, produzindo híbridos (KHUSH, 1997). O arroz *indica* espalhou-se da base do monte Himalaia até oeste e norte da Índia, Afeganistão, Irã e Sul do Sri Lanka. O arroz já foi mencionado 2500 anos A.C. por "Mohenjadara" e no Sri Lanka o arroz foi cultivado um pouco antes de 1000 anos A.C.. Na Grécia, ele pode ter sido introduzido através do Mediterrâneo pelos membros de Alexandre, na grande expedição à Índia no ano 324 A.C., contudo o arroz não foi cultivado na Europa antes do século XV ou XVI. Da Índia o arroz foi levado a Madagascar e até o leste da África e daí para a parte oeste da África, e foi ainda difundido para a parte leste e sudeste da Ásia e norte da China. O *japonica* foi, provavelmente, domesticado no norte e sudeste da Ásia ou sul da China, que ao se deslocar do norte da Ásia tornou-se uma espécie temperada de *japonica* (KHUSH, 1997). Da China, japonicas temperadas foram introduzidos na Coreia, e da Coreia ao Japão por volta do ano 100. Nas áreas montanhosas do sudeste da Ásia, o arroz cresce sem ser cultivado, resultando de cultivos móveis, anterior ao movimento das tribos de locais montanhosos para as planícies, onde introduziram a cultura do *japonica*. Do sudeste do continente da Ásia, ambos *indica* e *japonica* foram introduzidos na Malásia, Filipinas e Indonésia, e das Filipinas ao Taiwan. Migrantes da Malásia e Indonésia introduziram o arroz *japonica* tropical em Madagascar no ano 500 ou 600. Padres portugueses introduziram o japonica tropical da Indonésia na "Guiné Bissau" de onde ele se disseminou para o oeste da África. Assim, muitas variedades de arroz que crescem no oeste da África são *japonicas* tropicais. Os portugueses também introduziram o *japonica* tropical e o *indica* de planície (terras baixas) no Brasil e na Espanha, sendo disperso daí pela América Latina. Nos Estados Unidos, o primeiro relato de arroz data de 1685, e ele provavelmente foi introduzido de Madagascar através do comércio escravo.

No Brasil, muitas variedades são japônicas tropicais e variedades de terras baixas do grupo *indica* e ainda são encontradas todas as quatro espécies de arroz selvagem distribuídas nas Américas Central e do Sul, que são as espécies *O. glumaepatula* (diplóide), *O. alta*, *O. grandiglumis*, *O. latifolia* que são tetraplóides.

O arroz pertence à divisão *Angiospermae*, classe *Monocotyledonae*, ordem *Glumiflorae*, família *Gramineae*, subfamília *Oryzoideae* e gênero *Oryza* (WATANABE, 1997; VAUGHAN, 1989); possui apenas duas espécies cultivadas que são *O. sativa*, do Sudoeste Asiático (que se

espalhou pelo mundo todo) (Figura 2) e *O. glaberrima*, que tem o cultivo restrito à África Ocidental, e apresenta 21 espécies selvagens de arroz distribuídas por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (KHUSH, 1997; MORISHIMA, 1994; MARTINS, 1987).

Figura 2 - Limite de cultivo de *Oryza sativa* (VAUGHAN, 1989)

As espécies de arroz cultivado, e as selvagens *O. nivara*, *O. rufipogon*, *O. longistaminata*, *O. glumaepatula*, *O. meridionalis* e *O. barthii*, são todas pertencentes a um mesmo grupo, o complexo *sativa* de genoma AA (Tabela 1) (VAUGHAN, 1989). Mas diante das controvérsias com relação à nomenclatura do genoma AA das espécies de arroz selvagem, o genoma de *O. glumaepatula* foi classificado como sendo $A^{sp}A^{sp}$, pois a maioria dos acessos de *O. glumaepatula* da América do Sul mostraram-se bastante distintos de *O. rufipogon* (JULIANO; NAREDO; JACKSON, 1998). Mais tarde, Ge et al. (1999), utilizando marcadores de RAPD, confirmaram a classificação taxonômica de *O. glumaepatula* como sendo uma espécie diferente da forma americana de *O. rufipogon*.

As espécies tetraplóides do Brasil (Tabela 1) *O. alta*, *O. latifolia* e *O. grandiglumis*, pertencentes ao complexo *officinalis*, possuem padrões isoenzimáticos (GROVER; PENTAL, 1992) e moleculares (BUSO; RANGEL; FERREIRA, 1998a) geneticamente próximos sendo, portanto aconselhável que fossem consideradas como uma mesma espécie e não espécies

diferentes. Mas Oliveira (1993), avaliando 37 caracteres morfofenológicos por meio de análise multivariada, com variáveis canônicas, obteve nítida separação das espécies *O. alta*, *O. grandiglumis* e *O. glumaepatula*, sendo que a separação de *O. alta* e *O. grandiglumis* foi efetuada mediante análise de caracteres morfológicos reprodutivos. Veasey (2001, 2002) também confirma a separação das três espécies tetraplóides americanas por meio de caracteres morfológicos quantitativos e de marcadores isoenzimáticos.

Tabela 1 - Espécies do gênero *Oryza*, níveis de ploidia, genoma e distribuição geográfica (KHUSH, 1997)

Secção/Complexo	Espécies	2n	Genoma	Distribuição
<i>Oryza/sativa</i>	<i>O. sativa</i> L.	24	AA	Todo mundo
	<i>O. nivara</i> Sharma et Shastry	24	AA	Ásia tropical e subtropical
	<i>O. rufipogon</i> Griff.	24	AA	Ásia tropical e subtropical
	<i>O. barthii</i> A. Chev.	24	A ^g A ^g	África
	<i>O. glaberrima</i> Steud.	24	A ^g A ^g	Oeste da África
	<i>O. longistaminata</i> A. Chev. et Roher.	24	A ^g A ^g	África
	<i>O. meridionalis</i> Ng	24	A ^m A ^m	Austrália tropical
	<i>O. glumaepatula</i> Steud.	24	A ^{gp} A ^{gp}	América Central e do Sul
<i>Oryza/officinalis</i>	<i>O. punctata</i> Kotschy	24/48	BB, BBCC	África
	<i>O. minuta</i> Presl.	48	BBCC	Filipinas e Nova Guiné
	<i>O. officinalis</i> Wall	24	CC	Ásia Tropical e Subtropical
	<i>O. rhizomatis</i> Vaughan	24	CC	Sri Lanka
	<i>O. eichingeri</i> A. Peter	24	CC	Sul da Ásia e leste da África
	<i>O. latifolia</i> Desv.	48	CCDD	América Central e do Sul
	<i>O. alta</i> Swallen	48	CCDD	América Central e do Sul
	<i>O. grandiglumis</i> Prod.	48	CCDD	América Central e do Sul
	<i>O. australiensis</i> Domin.	24	EE	Austrália Tropical
<i>Oryza/Meyeriana</i>	<i>O. granulata</i> Nees et Arn.	24	GG	Sul e Sudeste da Ásia
	<i>O. meyeriana</i> (Zoll. Et Mor. Ex Steud.) Baill.	24	GG	Sudeste da Ásia
<i>Oryza/ridleyi</i>	<i>O. longiglumis</i> Jansen	48	HHJJ	Nova Guiné
	<i>O. ridleyi</i> Hook. F.	48	HHJJ	Sul da Ásia
??/??	<i>O. brachyantha</i> A. Chev. et Roher.	24	FF	África
	<i>O. schlechteri</i> Pilger	48	?	Papua Nova Guiné

1.1.2 Distribuição geográfica, características morfológicas e aspectos ecológicos das espécies brasileiras de arroz selvagem

A distribuição das espécies de arroz selvagens brasileiras (*O. latifolia*, *O. grandiglumis*, *O. alta* e *O. glumaepatula*) é aproximadamente parapátrica. *O. grandiglumis* encontra-se restrita à parte oeste da Amazônia e pode ser encontrada nas Bacias Hidrográficas do Solimões, Negro,

Japurá, Purus e Madeira. *O. alta* é de ampla distribuição incluindo o leste da Bacia Amazônica, algumas Bacias da costa norte do Brasil e alguns locais esparsos da Floresta Atlântica nos Estados leste e sudeste (bacias do Amazonas, rios Trombeta e Jari e Bacias pequenas do Estado do Amapá, baixada Maranhense e no vale do Ribeira em São Paulo). No Brasil, *O. latifolia* é restrita à Bacia do rio Paraguai, que começa no Pantanal Matogrossense. Em relação ao arroz selvagem diplóide, *O. glumaepatula*, este foi encontrado em todas as regiões onde existem os tetraplóides, exceto no Vale do Ribeira/SP, que é habitado exclusivamente pela *O. alta* (OLIVEIRA, 1994) (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição de *Oryza glumaepatula* (OLIVEIRA, 2002; modificado por KARASAWA, M.M.G.)

Quanto à variação fenotípica das características morfológicas, Veasey (2001) avaliando 11 populações de *O. glumaepatula*, sete de *O. grandiglumis*, quatro de *O. latifolia* e uma população *O. alta* verificou que para os caracteres, tais como, número de perfilhos, comprimento da folha e da lígula, diâmetro do caule, número de dias para o florescimento e número de panículas entre outros, *O. glumaepatula* mostrou ser a mais polimórfica, seguida pela espécie *O. latifolia* e por último *O. grandiglumis*. Oliveira (1993) avaliou 37 caracteres morfofenológicos de nove populações de *O. glumaepatula*, cinco de *O. alta* e cinco de *O. grandiglumis* e verificou

variabilidade inter e intrapopulacional. A variabilidade que foi observada, tanto em *O. glumaepatula* quanto nas espécies tetraplóides, evidenciou um padrão clinal ao longo do Rio Amazonas para os caracteres: comprimento do limbo, índice de prostração (Figura 4), razão comprimento/largura do limbo, diâmetro da arista e número de dias para o florescimento. Quanto à fenologia, foi observado que *O. glumaepatula* apresenta uma tendência de aumentar o número de dias de florescimento no sentido foz-nascente. O padrão de distribuição do florescimento nessas espécies foi unimodal nas populações tetraplóides (florescimento de maio a junho) e bimodal para a maioria das populações de *O. glumaepatula* (florescimento de abril a agosto e de outubro a dezembro), que é bastante semelhante ao de *Oryza sativa*. Também estudando caracteres fenotípicos, Chaibub Neto (1998) avaliou quatro populações de *O. glumaepatula*, coletadas no Pantanal Matogrossense, e verificou variação altamente significativa entre as populações para os caracteres: comprimento do limbo, do colmo e panícula; número de colmos, de folhas e panículas por planta, entre outros.

Figura 4 - Índice de prostração das populações de *Oryza glumaepatula* ao longo do Rio Solimões (OLIVEIRA, 1993)

1.1.3 Sistemas reprodutivos em *Oryza*, freqüências em angiospermas e implicações

O modo de reprodução do arroz cultivado, *Oryza sativa* que apresenta flores hermafroditas (Figura 4), é o de autofecundação. Com relação às espécies selvagens de *Oryza* foram constatados sistemas reprodutivos autógamo, alógamo, misto e de reprodução vegetativa

(OLIVEIRA, 2002). Oka e Morishima (1967) relataram que as formas perenes de *Oryza* apresentavam taxas de cruzamento entre 20% e 45%, enquanto que as anuais *O. sativa* e *O. glaberrima* apresentavam-se completamente autógamas e que neste grupo não teriam sido detectados sistemas de autoincompatibilidade. Barbier (1989a), estudando populações selvagens anuais de dois ecótipos de *O. rufipogon*, concluiu que todas as anuais se reproduziam sexuadamente enquanto as perenes apresentavam sistema reprodutivo que variou desde o assexual até o misto (sexual e assexual). Aparentemente o sistema misto de reprodução estava relacionado ao distúrbio ambiental. As estimativas das taxas de cruzamento obtidas a partir dessas populações, mediante o uso de isoenzimas, foram de 4% para a anual e de 50% e 56% para as perenes (BARBIER, 1989b). Em *O. rufipogon* Morishima e Barbier (1990) observaram que algumas populações apresentavam polinização cruzada enquanto que outras apresentam sistema reprodutivo predominantemente autógamo, estimando as taxas de cruzamentos que variaram de 5% a 60%. Akimoto; Shimamoto e Morishima (1998) alertam que o sistema reprodutivo de *O. glumaepatula* deveria ser de autofecundação, pois as heterozigosidades observadas, através de isoenzimas, foram muito menores que as esperadas. Buso et al. (1998b), também estudando o sistema reprodutivo de *O. glumaepatula*, através de marcadores RAPD e de isoenzimas, de quatro populações, encontrou para ambos os marcadores os mesmos resultados esperados para uma espécie de planta autógama. Brondani et al. (2002) avaliando populações de *O. glumaepatula* por meio de microssatélites constatou níveis de cruzamento de 18,8%, que também aponta para o predomínio de autogamia na espécie.

Figura 4 - Inflorescência típica de *Oryza* (GRIST, 1975)

Quesada; Lobo e Espinosa (2002), estudando o sistema reprodutivo de nove populações de *Oryza latifolia*, provenientes de diferentes habitats ecológicos, por meio de seis marcadores isoenzimáticos observaram altos níveis de diversidade genética na variabilidade entre populações, mas a maioria das populações foi monomórfica para um genótipo, sugerindo um pequeno fluxo gênico dentro de populações, e não observaram nenhuma variação dentro de grupos de progênies. Concluindo, os autores comentam que a alta frequência no padrão da heterozigozidade observada sugere que o sistema reprodutivo de *Oryza latifolia* pode ser mais complexo e que futuras pesquisas poderão explicar melhor o padrão genético bem como a biologia reprodutiva da espécie.

Bres-Patry et al. (2001), avaliando o surgimento das formas daninhas de arroz, coletadas em Camargo na França, através do uso de mapeamento de QTLs em linhagens duplo haplóides, observaram segregações distorcidas dos segmentos cromossômicos criando genes gametofíticos e estéreis, evidenciando, para vários locos de QTLs, cruzamentos distantes entre *indica* e *japonica*. Por outro lado, Tang; Morishima e Tang, (1997), que já haviam estudado a origem de formas daninhas de arroz, atribuíram tal fato a cruzamentos distantes entre cultivares relacionadas. Segundo os mesmos autores, uma outra possibilidade seria que híbridos derivados de hibridações naturais poderiam ter ocorrido entre as formas anteriormente existentes, entre o arroz selvagem e o cultivado, mas que não teriam sido extintas.

O sistema reprodutivo de uma espécie tem grande efeito sobre a composição genética de suas populações (HAMRICK, 1982), pois é ele quem determina o modo de transmissão de genes de uma geração à outra. As espécies de plantas existentes enquadram-se em cinco classes de reprodução sexuada: predominantemente autógamas e alógamas, mistas (com autofecundação e exocruzamento), parcialmente apomíticas e parcialmente autógamas nos gametófitos (BROWN, 1990). Já, Fryxel (1957) classifica em quatro os sistemas reprodutivos existentes nas plantas (Figura 5) onde se verifica que a alogamia é o sistema reprodutivo mais comum entre as angiospermas. Outro fato importante a ser constatado é que, para adotarem estes sistemas reprodutivos, as angiospermas utilizam diferentes estratégias reprodutivas (Figuras 5 e 6) as quais, de certa forma, otimizam estes sistemas.

Espécies autógamas apresentam como estratégia reprodutiva flores hermafroditas (estrutura masculina e feminina em uma mesma flor) autocompatíveis sendo geralmente polinizadas pelo vento (VOGLER; KALISZ, 2001) e às vezes também por insetos, assim no caso de não ocorrer a fertilização cruzada, estas poderão se autofecundar promovendo sucesso reprodutivo (KALISZ; VOGLER; HANLEY, 2004).

Figura 5 - Frequência dos sistemas e das estratégias reprodutivos em angiospermas, respectivamente da esquerda para a direita (ilustração realizada por KARASAWA, M.M.G. seguindo a descrição dos autores)

Figura 6 – Esquemas das estratégias reprodutivas adotadas pelas angiospermas (AINSWORTH, 2000; modificado por KARASAWA, M.M.G.)

As espécies alógamas, por sua vez, podem adotar qualquer uma das estratégias (flores hermafroditas, dióicas – plantas possuem sexos separados, e monóicas – flores possuem sexos separados) (Figura 6). Espécies alógamas de flores hermafroditas geralmente apresentam sistemas de autoincompatibilidade, os quais evitam a ocorrência de autofertilização. Caso o sistema de autoincompatibilidade não se manifeste e a espécie seja polinizada por insetos podem ocorrer todos os níveis de fertilização desde a autogamia absoluta até a alogamia, promovendo, assim, o aparecimento das espécies mistas (VOGLER; KALISZ, 2001).

Dentre as diferentes formas de reprodução, a polinização cruzada (alogamia) é a reprodução sexual que possui maior potencial de rearranjo da diversidade genética gerando potencialmente infinitas combinações (RICHARDS, 1997), as quais servem de substrato para os fatores evolutivos (BROWN, 1990) determinando a capacidade de sobrevivência das espécies ao longo das gerações (CROW; KIMURA, 1965). Contudo, a autofecundação é uma prática comum em plantas, sendo que aproximadamente 20% são autógamas e 33% apresentam sistema misto (KALISZ; VOGLER; HANLEY, 2004; HERLIHY; HECKERT, 2002). Populações de espécies predominantemente autofertilizadas apresentam indivíduos homozigóticos na maioria dos locos, e como resultado há poucos genótipos presentes nas populações dessas espécies e as frequências genotípicas diferem amplamente das expectativas baseadas nas pressuposições de cruzamentos ao acaso (HAMRICK, 1982). Um dos principais problemas apontados para espécies que se autofertilizam é que a homogeneidade dentro de populações e famílias, conseqüentemente, diminui a flexibilidade na resposta as mudanças ambientais e em condições de mudanças extremas poderão ser completamente extintas devido à fixação dos alelos (RICHARDS, 1997; HEDRICK, 2001; HERLIHY; HECKERT, 2002; FRANKHAM, 2003). Contudo, em ambientes favoráveis este tipo de plantas poderá apresentar comportamento agressivo, típico de plantas daninhas, estabelecendo-se rapidamente no local (HOLSINGER, 2000).

Como o sistema reprodutivo é o maior determinante da estrutura e da diversidade genética presente em populações naturais, espécies autógamas necessitam de cuidados especiais, pois é necessário identificar o maior número possível de populações para que a diversidade seja preservada ao máximo.

1.1.4 Diversidade genética em populações de plantas

O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética ocorrem devido às interações de um conjunto complexo de fatores evolucionários, como variações no conjunto gênico, organização destas variações dentro de genótipos, distribuição espacial dos genótipos, sistema de reprodução, dispersão das progênies, seleção, deriva, mutação, eventos casuais e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem a futuras populações (HAMRICK, 1983; LOVELESS; HAMRICK, 1984).

A compreensão dos processos microevolutivos dentro das populações nativas tem prosperado graças aos estudos da organização da variabilidade ou estrutura genética de populações, com o intuito de melhorar estratégias de domesticação, manejo e conservação dessas espécies (CARTHEW, 1993). Assim sendo, para que se possa preservar uma espécie, deve-se conservar ao máximo a quantidade de seus recursos genéticos. De acordo com Moran e Hopper (1987), esses recursos incluem toda a variação herdável que ocorre dentro de todos os indivíduos de uma espécie. E para que se possa avaliá-los são necessárias informações da estrutura genética de suas populações o que envolve medidas de diversidade genética entre e dentro das populações (BROWN; MORAN, 1981). Os estudos de variabilidade genética em populações naturais devem ser direcionados para a quantificação da variação existente e na caracterização dos níveis de variabilidade das populações, devendo-se lembrar que, em espécies de plantas, os fatores que influenciam na distribuição da variabilidade genética incluem o tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica da espécie, o modo de reprodução, o mecanismo de dispersão de sementes e o tipo de comunidade onde a espécie é freqüente (HAMRICK, 1983).

Segundo Weir e Basten (1990), a freqüência de heterozigotos é um importante indicador da diversidade genética, pois cada heterozigoto detém alelos diferentes e, portanto, representa melhor a variação existente. No entanto, a heterozigosidade esperada ou diversidade gênica conforme a metodologia de Nei (1973), é uma medida mais apropriada por apresentar a variação tanto em populações de espécies autógamas como alógamas.

A estimativa da freqüência de um alelo particular em uma população, chamada de freqüência gênica ou alélica, é considerada fundamental nos estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas freqüências gênicas (NEI, 1987).

Conforme Loveless e Hamrick (1984), as populações de plantas não são organizadas aleatoriamente em grupos de genótipos, mas são estruturadas no espaço e no tempo. Essa estrutura pode ser expressa entre plantas geograficamente distintas, dentro de um grupo local de plantas, ou mesmo na progênie dos indivíduos. Portanto, em situações em que há uma seleção diferenciada em estágios do ciclo de vida, podem ocorrer diferenças genéticas significantes entre classes de idade, refletindo numa alteração da estrutura genética no tempo. Em outra situação, a adaptação em um microambiente é uma característica comum de populações de plantas e sua existência pode levar a uma distribuição não aleatória de genótipos dentro de populações o que leva a uma alteração da estrutura no espaço.

A estrutura genética é o resultado da ação conjunta de forças evolutivas como a mutação, migração, seleção e deriva que operam dentro de um contexto histórico e biológico de cada espécie de planta. Essas forças violam as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. A mutação, migração e a seleção tendem a mudar, de maneira previsível, a frequência gênica tanto em quantidade como em direção. Essa estrutura pode se manifestar entre populações geograficamente distintas dentro de um grupo de plantas, ou mesmo nos indivíduos de uma progênie.

Em suma, a estrutura genética pode ser definida como sendo a distribuição não aleatória de alelos ou de genótipos no espaço e no tempo prescindindo dos processos meióticos que também podem afetar as frequências alélicas e genotípicas.

Alguns fatores ecológicos que influenciam a estrutura genética das populações podem ser determinados por outros aspectos de sua história de vida (LOVELESS; HAMRICK, 1984) (Tabela 2).

Tabela 2 - Fatores que afetam a estrutura genética de populações e seus efeitos (LOVELESS; HAMRICK, 1984)

(continua)

Fatores	Variação genética	Estrutura genética	
		entre	dentro
Estratégia reprodutiva	dentro		
Hermafrodita	Médio em cruzamentos mistos e baixo para autofecundação	Depende do sistema reprodutivo; autofecundação causa maior divergência	Potencial para a subdivisão; depende do sistema reprodutivo e da forma de dispersão do pólen; a morfologia floral afeta o N_e e a área de vizinhança, aumentando ou diminuindo
Monóica	Potencialmente elevada, se for alógama	Fertilização cruzada e fluxo de pólen elevados reduzem a diferenciação	Depende do sistema reprodutivo e dos polinizadores; chance de subdivisão reduzida e elevada homogeneidade
Dióica ou com presença de heterostilia	Elevada	Fertilização cruzada e dispersão de pólen reduzem a diferenciação	Alogamia reduz a subdivisão; contudo acasalamentos associativos e relação sexual desigual podem reduzir o N_e e gerar diferenciação
Sistema reprodutivo			
Autógamo	Baixa; heterozigosidade baixa	Divergência elevada devido à oscilação e fluxo gênico reduzido	Heterozigosidade e diversidade gênica reduzida dentro de famílias, variação genotípica elevada, N_e pequeno, fluxo gênico reduzido e elevada subdivisão
Misto	Maior variabilidade	Potencial para diferenciação; depende do nível de autofecundação e pode variar no tempo	Potencialmente subdividida; depende do balanço entre autofecundação e fertilização cruzada
Alógamo	Mais elevada; elevada heterozigosidade	Divergência reduzida devido ao maior fluxo gênico	Maior N_e e área do grupo de vizinhança, subdivisão reduzida
Apomítico	Baixa, mas depende do número de unidades genéticas (genets)	Efeito fundador e oscilação promovem divergência; perda de variabilidade genotípica é aumentada pela falta de recombinação	Clones homogêneos; população muito subdividida ou monomórfica, dependendo do número de genets
Apomítico facultativo	Moderada; depende do sistema reprodutivo e de outros fatores	Depende de outros fatores	Depende de outros fatores
Mecanismo de polinização			
Insetos/Aves/Morcegos	Insetos reduzem a variabilidade	Insetos reduzem a variabilidade	Movimento limitado ou para o vizinho mais próximo reduz o N_e , promove subdivisão, estrutura de família e endogamia. Animais com elevada variância no pólen aumentam o N_e ; vetores grandes que se deslocam bastante reduzem a subdivisão e elevam o N_e e a área vizinha
Vento	Elevada	Elevada	N_e e área vizinha são elevadas e a subdivisão é reduzida

Tabela 2 - Fatores que afetam a estrutura genética de populações e seus efeitos (LOVELESS; HAMRICK, 1984)

(conclusão)

Fatores	Variação genética	Estrutura genética	
Dispersão da semente	dentro	entre	dentro
Gravidade	Intermediária	Intermediária	Movimento limitado ou para o vizinho mais próximo reduz o N_e promove estrutura familiar, endogamia e subdivisão
Cápsula explosiva; semente alada	Intermediária elevada	Intermediária elevada	Elevada variância na distância de dispersão, aumenta N_e e diminui a subdivisão
Ingerida ou transportada por animal	Intermediária baixa	Intermediária baixa	Dispersão pelo vento pode reduzir a agregação e estrutura familiar
Dormência da semente			
Ausente	Determinada por outros fatores	Balanços análogos àqueles do tamanho populacional	Dispersão de pólen por animais é mais suscetível a densidade; alta densidade reduz o fluxo de pólen e aumenta a subdivisão
Presente	Aumenta o potencial de variação genética	Reduz a divergência; retarda a perda de alelos por deriva	Retarda a perda de alelo, aumenta o tempo de geração dos genótipos, aumenta N_e , e inibe a subdivisão
Tamanho da população			
Grande e estável	Elevada	Nas populações de todos os tamanhos, ocorre um balanço entre a migração e a oscilação: Pequenas populações promovem divergência devido a oscilação, mas são mais fortemente influenciadas por pequeno número de propágulos migrantes	Potencialmente subdivididas, dependendo do comportamento do polinizador
Pequena e estável	Menor devido à oscilação		Provavelmente homogêneas dependendo do fluxo gênico e da magnitude da oscilação
Tamanho flutuante	Baixa, devido a oscilação	Depende da quantidade de migrantes	Homogênea devido a perda da variabilidade e endogamia durante os períodos de tamanho pequeno
Densidade da população			
Alta	Sem previsão	Balanços análogos àqueles do tamanho populacional	A dispersão do pólen por animais depende da densidade. Densidade alta restringe o fluxo de pólen e aumenta a subdivisão
Baixa	Sem previsão	Baixa densidade pode promover o fluxo do pólen a grandes distâncias, aumentando a homogeneidade	Baixa densidade pode aumentar o deslocamento do pólen (área vizinha) ou reduzir as visitas do polinizador (diminui N_e e área vizinha). Com a polinização pelo vento, menores densidades diminuem o N_e mas não a área vizinha, levando ao aumento da subdivisão

N_e = tamanho efetivo populacional

Para quantificar a estrutura genética de populações têm sido empregadas três metodologias: estatísticas F (WRIGHT, 1951), diversidade gênica (NEI, 1973) e os coeficientes de coancestria de Cockerham (COCKERHAM, 1969; VENCOSKY, 1992). Em função do modelo de Wright (1951) e de Nei (1973) não considerarem o erro associado à amostragem, eles tendem a ser viciados, sendo tanto maiores quanto menor for o tamanho da amostra. Mas, segundo Reis (1996), as três metodologias possuem bases genéticas similares e se complementam em relação ao significado biológico das estimativas obtidas, especialmente se os marcadores forem neutros, a amostragem for aleatória e as populações forem originadas de uma única população ancestral. Desta forma, as estatísticas F permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações (F_{ST}), dos níveis médios de endogamia ao nível populacional (F_{IS}) e da endogamia total (F_{IT}). Os coeficientes de coancestria (θ) permitem a avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia, além de possibilitar a obtenção de estimativas de endogamia, a partir de uma base não viesada. A análise da divergência gênica em populações subdivididas permite a comparação dos níveis de heterozigiosidade entre e dentro das populações, assim como a obtenção de uma estimativa de divergência, a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas de F_{ST} e θ .

De acordo com Wright (1965) e Cockerham (1969), as estatísticas F podem ser apresentadas da seguinte forma:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST}),$$

onde:

F_{IT} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (em função do sistema reprodutivo e da subdivisão),

F_{IS} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (devido ao sistema reprodutivo),

F_{ST} = índice de fixação ou coeficiente de endogamia interpopulacional (devido à subdivisão).

1.1.5 Uso de marcadores microssatélites

Os marcadores moleculares microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) têm sido usados, nos últimos anos, em diversos organismos. Em plantas, uma busca em bancos de dados de seqüências de DNA publicadas, revelou que sítios de microssatélites são largamente distribuídos

com uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Dentro da classe de marcadores moleculares existentes, os microssatélites são os que ocorrem em maior frequência e são aleatoriamente distribuídos (WU; TANKSLEY, 1993). As estimativas da taxa de mutação de microssatélites em *Escherichia coli* em sistemas *in vivo* são elevadas (10^{-2}) quando comparados à taxa de mutação de ponto que ocorre na ordem de 10^{-9} e 10^{-10} (HANCOCK, 2000). Acredita-se serem dois os mecanismos responsáveis pela variação gerada no número de repetições em tandem: recombinação e replicação por escorregamento da DNA polimerase. Espera-se que a recombinação gere uma ampla distribuição na mudança dos comprimentos com taxa de 5×10^{-2} , que pode ser considerada elevada (JEFFREYS et al., 1998). Assim, na comparação de seqüências se espera uma estreita correlação entre as diferenças de comprimento acumuladas e o número de eventos de crossing-over desiguais que o produzem. A replicação por escorregamento que ocorre durante a replicação do DNA parece favorecer pequenas mutações de ponto no número de repetições em tandem (VALDES; SLATKIN; FREINER, 1993). As taxas com que os variantes são gerados por este processo parecem ser da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} (EDWARDS et al., 1992). A distribuição dos microssatélites no indivíduo é função da história de evolução no genoma e dos efeitos da pressão de seleção. Entre as espécies de plantas estudadas, a frequência dos microssatélites mostra relação inversa entre o DNA repetitivo e o tamanho do genoma, permanecendo constante nas porções transcritas do genoma. Isto *indica* que a maioria dos microssatélites reside em regiões que pré-datam a recente expansão do genoma em muitas plantas. Assim sendo, a abundância de microssatélites em regiões transcritas e outras regiões de cópia simples do genoma deve fazer deste um marcador sempre mais atrativo na análise genética de plantas (MORGANTE; HANAFEY; POWELL, 2002).

O uso de sondas complementares pode ser feito com sucesso para gerar *fingerprint* (impressão digital de DNA) em diversos organismos (FUNGARO; VIEIRA, 2001), podendo ser utilizados como marcadores genotípicos para estudo da diversidade genética, construção de mapas genéticos e caracterização de germoplasma (SOUZA, 2001).

A identificação de acessos de plantas cultivadas constitui-se numa etapa importante de programas de melhoramento e é essencial nos processos de patenteamento de cultivares, pois as características morfológicas usadas na sua identificação são bastante limitadas devido ao baixo número de marcas/caracteres disponíveis. Os marcadores de DNA também vêm sendo importantes na avaliação das relações/critérios genéticos no manejo de bancos de germoplasma, pois fornecem informações sobre a redundância e eficiência da coleção, sendo usados também

para identificar e eliminar duplicatas. Em plantas, o conhecimento do sistema reprodutivo é essencial para a aplicação de métodos de melhoramento genético, e os marcadores moleculares têm sido úteis na estimação de taxas de autofecundação em populações em que se desconhecem marcas morfológicas; ainda podem ser utilizados na análise de ligação de genes e na seleção assistida de caracteres de importância agrônômica; assim, o fenótipo molecular em um determinado indivíduo deve indicar com grande probabilidade se o mesmo possui o fenótipo agrônômico (FUNGARO; VIEIRA, 2001; GRATTAPAGLIA, 2001). Os microssatélites têm sido altamente indicados e usados nos estudos de genética de populações de plantas nativas devido à sua reprodutibilidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), por serem considerados variantes geneticamente neutros e por serem geneticamente mais informativos para este tipo de estudo (BRONDANI et al., 2002), pois marcadores tradicionais muitas vezes têm fornecido estimativas estatísticas inadequadas da diferença entre grupos de espécies ameaçadas de extinção devido à pequena variação existente (HEDRICK, 2001), especialmente em populações com baixa diversidade ao nível de DNA ou quando não é possível a sua detecção com outro marcador (PAETKAU et al., 1995). Os locos SSR parecem ser geneticamente estáveis, possuem expressão co-dominante, são altamente multialélicos e apresentam segregação mendeliana. Em uma população, todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados, fazendo com que os microssatélites estejam entre os marcadores moleculares mais apropriados para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos, e estudos de genética de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FUNGARO; VIEIRA, 2001).

Atualmente, encontram-se descritos diferentes tipos de seqüências para as mais diferentes culturas. Quando seqüências únicas que flanqueiam um dado microssatélite são conhecidas, *primers* complementares podem ser sintetizados e utilizados como iniciador loco-específico em reações de PCR. A detecção de seqüências SSR, via PCR, é feita por meio da técnica de eletroforese utilizando-se gel de poliacrilamida ou agarose de alta resolução, sendo necessário um gel adequado para a separação de segmentos que diferem por poucos pares de bases, dependendo do número de nucleotídeos do elemento repetido no microssatélite. A visualização de bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração de brometo de etídio, nitrato de prata ou através de auto-radiografia ao se utilizar *primer* marcado com radioisótopos na reação de PCR.

Os produtos de amplificação de diferentes indivíduos, visualizados após a eletroforese, freqüentemente diferem em tamanho em função de serem freqüentes na população diferenças no

número de unidades de repetições no loco de microsatélite. Cada unidade de microsatélite assim detectada é um loco polialélico e, em um indivíduo diplóide, a amplificação de um loco resultará em uma ou duas bandas, respectivamente, dependendo se é homozigótico ou heterozigótico (FUNGARO; VIEIRA, 2001).

Um dos grandes problemas na utilização desses marcadores é o grande volume de trabalho necessário para o desenvolvimento de *primers* específicos para o loco de microsatélites de cada espécie. Porém, tem sido observado que ocorre conservação de sítios de microsatélites entre espécies relacionadas. É possível, portanto, aproveitar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; ZUCCHI, 2002).

Em arroz muitos *primers* têm sido citados na literatura (OLUFOWOTE et al., 1997); TALAG et al., 2000; SHASHIDHAR et al., 2001)) e utilizados. Entretanto, se for considerada especificamente a espécie *Oryza glumaepatula* poderemos citar, em especial, os trabalhos realizados por Brondani et al. (2001, 2002) que apresentam primers selecionados e testados para esta espécie.

Talag et al. (2000) avaliaram o polimorfismo de 80 microsatélites em progênies de cruzamentos entre *Oryza sativa* e *O. glaberrima* para verificar a introgressão de caracteres relacionados à maior tolerância ao estresse biótico e abiótico. Dos microsatélites avaliados apenas 54 mostraram-se polimórficos para IR64 e 14 acessos de *O. glaberrima* e, considerando apenas os acessos de *O. glaberrima*, somente 30 microsatélites mostraram polimorfismo.

Shashidhar et al. (2001) também utilizaram os marcadores de microsatélites em *O. sativa* com o intuito de selecionar marcas moleculares associadas ao máximo alongamento da raiz, um caráter quantitativo que confere resistência à seca, e puderam identificar duas marcas. Com os primers específicos, os parentais, as plantas dos acessos tradicionais e de outras populações puderam ser mapeadas, facilitando o melhoramento do caráter. Por outro lado, Ravi e Maheswaran (2001) avaliaram a diversidade genética de 40 variedades e 5 espécies selvagens de arroz, utilizando 22 caracteres qualitativos e 9 quantitativos, 21 marcadores de isoenzimas, 268 de RAPD e 71 microsatélites. Dentre os utilizados, os de RAPD e microsatélites foram os mais polimórficos, com 95% e 100%, respectivamente. Os microsatélites mostraram-se polialélicos, sendo que estes marcadores, quando usados para avaliar amostras de bulks e de sementes individuais, detectaram com maior facilidade a heterogeneidade em lotes de sementes coletados em diferentes estados. Já, Govindaraj (2001) utilizou marcadores microsatélites e RAPD para

avaliar a qualidade da semente de duas populações F_2 , verificando que o marcador molecular microssatélite também foi mais polimórfico que RAPD (61,11% e 23,5%, respectivamente) e afirma que aquele pode ser usado para encontrar locos genéticos com maior efeito sobre caracteres complexos relacionados à qualidade do grão para futuro melhoramento do arroz. Nagaraju et al. (2002) utilizaram marcadores microssatélites no estudo do arroz aromático Basmati e não Basmati, e os resultados obtidos indicaram que o conjunto de variedades utilizadas deve possuir um único ancestral em comum.

Zucchi (2002) analisando a estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC com marcadores RAPD e SSR observou alta variabilidade entre as populações quando analisadas com ambos os marcadores e que as metodologias mostraram congruência na caracterização genética, sendo a análise com RAPD muito mais trabalhosa, mas que concorda com as estimativas populacionais das SSR, as quais foram mais sensíveis, e que a correlação entre os marcadores foi positiva para matrizes de distância genética.

Blair; Hedetale e McCouch (2002) estudando a diversidade alélica em 72 acessos de arroz cultivado com primers de microssatélite marcados verificaram que houve boa correlação dos resultados com análises prévias de isoenzimas e RFLP e que estes poderão ser usados em análises de fingerprint e no agrupamento de variedades de arroz.

Ishii e McCouch (2000) estudando o genoma de cloroplastos de arroz e outras gramíneas verificaram que em todas as cultivares de arroz o número de alelos por loco variou de um a cinco, todos com padrão monomórfico e que o valor médio do conteúdo de polimorfismo nos locos polimórficos foi de 0,54 para 13 cultivares. Já quando compararam espécies selvagens de arroz com outras gramíneas, a sua relação filogenética concordou com outros estudos com diferentes marcadores, contudo concluíram que as diferenças baseadas nos microssatélites de cloroplastos não podem estimar a distância genética entre estas espécies divergentes e que a microssintenia é evidente. A ocorrência de atividade envolvendo motivos de regiões específicas de microssatélites no genoma do cloroplasto do arroz parece ser muitas vezes um fenômeno genoma específico. Citam ainda, que os pares de *primers* usados neste estudo identificou motivos de microssatélites com atividade mutacional, degenerados, interrompidos, altamente conservados e mutacionalmente inertes de gêneros distantemente relacionados.

Akagi et al. (1997) afirmam que as repetições AT são polimórficas em genomas de arroz e podem ser usadas para distinguir cultivares pouco relacionados. Olufowote et al. (1997), estudando diferenças entre os marcadores RFLP e SSR, observaram que tanto as cultivares antigas

quanto as modernas de arroz apresentaram um grande número de alelos para ambos os marcadores, mas que as SSR foram mais precisas para discriminar pequenas diferenças entre indivíduos, e que os resultados encontrados sugerem que o uso de quatro microssatélites bem escolhidos deve ser um método eficiente para avaliar a heterogeneidade dos acessos de arroz.

Os microssatélites apresentam vantagens sobre os métodos clássicos da genética biométrica na análise da estrutura genética de populações, tais como: a herança das características detectadas (bandas no gel) pode ser facilmente demonstrada; a maioria dos locos é codominante e as frequências alélicas podem ser calculadas diretamente sem a necessidade de delineamentos genéticos; as estimativas da variabilidade genética podem ser comparadas diretamente entre populações ou espécies e um conjunto de locos pode ser acessado usando-se pequena quantidade de material. A utilização de microssatélites, pela sua neutralidade, apresenta como principal vantagem a possibilidade de caracterização de forças evolutivas sem a influência da seleção, permitindo maior compreensão do comportamento das populações naturais, em termos de deriva genética e migração (ALVES, 2002).

Apesar da importância dos microssatélites para estudos de evolução e conservação genética, Hedrick (1999) relaciona três pontos que merecem ser levado em consideração: a heterozigosidade tende a ser alta dentro das populações, o que acaba produzindo baixa diferenciação entre elas; os locos são extremamente sensíveis à redução do tamanho populacional podendo gerar, portanto, elevadas distâncias genéticas; e, como os marcadores são neutros, as diferenças estatísticas significantivas podem não estar correlacionadas com diferenças biológicas expressivas, tanto pela falta de correlação entre os locos adaptativos e os locos altamente variáveis, como também pelo poder estatístico intrínseco desses locos, que é bastante elevado.

Referências

- AINSWORTH, C. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. **Annals of Botany**, Oxford, v.86, p.211-221, 2000
- AKAGI, H.; YOKOZEK, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theoretical Applied Genetic**, Bangor, v.94, p. 61-67, 1997.
- AKIMOTO, M.; SHIMAMOTO, Y.; MORISHIMA, H. Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by life-history traits. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 10, p. 1371-1381, Oct. 1998.
- ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. Piracicaba, 2002. 146p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ANDO, A. Coletas de germoplasma de espécies selvagens e relativas ao gênero *Oryza* no Brasil, Paraguai e Argentina. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 15., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/USP, 1998. p. 22-26.
- ANDO, A.; MORISHIMA, H.; SILVA, E.F.; AKIMOTO, M.; CHAIBUB, E.N.; MARTINS, P.S. Collecting wild relatives of rice in Paraguay and northeastern Argentina. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 118, p. 51-52, 1999.
- ANGLADETTE, A. **El arroz**. Blume:Barcelona, 1969. 867p.
- BARBIER, P. Genetic variation and ecotypic differentiation in the wild rice species *Oryza rufipogon*. I. Population differentiation in life-history traits and isozymic loci. **Journal of Genetics**, Bangalore, v.64, p.259-271, 1989a.
- BARBIER, P. Genetic variation and ecotypic differentiation in the wild rice species *Oryza rufipogon*. II. Influence of mating system and life-history traits on the genetic structure of populations. **Journal of Genetics**, Bangalore, v.64, p.273-285, 1989b.
- BLAIR, M.W.; HEDETALE, V.; MCCOUCH, S.R. Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.105, n.2/3, p.449-457, 2002.
- BRAR, D.S.; KHUSH, G.S. Alien introgression in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 47-55, sept., 1997.
- BRES-PATRY, C.; LORIEUX, M.; CLEMENT, G.; BANGRATZ, M.; CHESQUIERE, A. Heredity and genetic mapping of domestication-related traits in temperate *japonica* weedy rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, n.1, p.118-126, 2001.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula* - derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *Oryza sativa*. **Hereditas**, Lund, v.134, p.59-71, 2001.

BRONDANI, C.; RANGEL, P.H.N.; BRONDANI, R.P.V.; FERREIRA, M.E. QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.104, p.1192-1203, 2002.

BROWN, A.H.D. Genetic characterization of plant mating systems. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLE, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.). **Plant populations genetics, breeding, and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p.145-162.

BROWN, A.H.D.; MORAN, G.F. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: CONCKLE, M.T. **Isozymes of North American Forest Insects**. Berkeley: U.S. Department Agriculture, 1981. p. 1-10.

BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. Polimorfismo de seqüências nucleares cloroplásticas e mitocondriais na análise filogenética de espécies silvestres e cultivadas de arroz (*Oryza*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n.3, p.181, 1998a.

BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of South American wild rice population (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, n.1, p.107-117, jan., 1998b.

CARTHEW, S.M. Population genetic structure of *Banksia spinulosa*. **Heredity**, London, v.70, n.6, p.566-573, 1993.

CHAIBUB NETO, E. **Padrões de variação fenotípica e isoenzimática de quatro populações de *Oryza glumaepatula* do Pantanal matogrossense**. Relatório apresentado à FAPESP, dez. 1998.

CHEN-BAOZHANG; CHEN-BZ. Phytolith analysis and study on the origin of cultivated rice (*Oryza sativa*). **Acta Geologica Sinica**, Peking, v.23, n.11, p.114-118, 1997. (Resumo)

CHEN, B.Z.; JIANG, Q.; CHEN-B.; JIANG, Q.H. Antiquity of the earliest cultivated rice in central China and its implications. **Economic Botany**, New York, v.51, n.3, p.307-310, 1997.

COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lancaster, v.23, p.72-84, 1969.

CROW, J.F.; KIMURA, M. Evolution in sexual and asexual populations. **American Naturalist**, Chicago, v.99, p.439-450, 1965.

EDWARDS, A.; HANNIBD, H.A.; JIN, L.; CASKEY, C.T.; CHAKROBORTY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, San Diego, v.12, p.241-253, 1992.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2nd. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.

FRIXEL, P. Mode of reproduction of higher plants. **Botanical Review**, Lancaster, v.23, p.135-233. 1957

FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge:United Kingdom, 1998. 299p.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendue Biologies**, Paris, v.326, p.22-29, 2003.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares. In: **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba:Agropecuária, 2001. p. 154-200.

GE, S.; OLIVEIRA, G.C.X.; SCHAAL, B.A.; GAO, L.Z.; HONG, D.Y. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. **Heredity**, London, v.82, p.638-644, jun.,1999.

GOVINDARAJ, P. Mapping of the genetic loci associated with grain quality traits in rice using SSR and RAPD markers. **Manila: Food security and environment protection in the new millenium**. 2001. p.274.

GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers for fores trees: Where are we going? In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P.; SAJUYAMA, N.S. (Ed.). **BIOWORK II: plant breeding in the turn of millenium**. Viçosa:UFV, 1999. p.79-102.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In.: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis:Fundação MT, 2001. p.967-993.

GRIST, D.H. **Rice**. London:Logman, 1975. 601p.

GROVER, A.; PENTAL, D. Interrelationships of *Oryza* species based on electrophoretic patterns of alcohol dehydrogenase. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.70, n.2, p.352-358, 1992.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v.69, n.10, p.1685-1693, 1982.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHNEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1983. P.335-348.

HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristic and eletrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.10, p.173-200, 1979.

- HEDRICK, P.W. **Genetics of populations**. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1999. 552p.
- HEDRICK, P.W. Conservation genetics: Where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v.16, n.11, p.629-636, 2001.
- HERLIHY, C.H.; ECKERT, C.G. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. **Nature**, London, v.416, 320-323, mar., 2002.
- HOLSINGER, K.E. Reproductive systems and evolution in vascular plants. **Proceedings of National Academy of Science USA**, Washington, v.97, n.13, p.7037-7042, jun. 2000.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALES-DE-LÉON, D. Laboratory protocols CIMMYT, 2nd ed. **Applied Molecular Genetics Laboratory**. El Batán, Mexico: CIMMYT, 1994. 1v.
- ISHII, T.; MCCOUCH, S.R. Microsatellites and microsynteny in the chloroplast genomes of *Oryza* and eight other Gramineae species. **Theoretical and applied Genetics**, Berlin, v.100, n.8, p.1257-1266, 2000.
- JEFFREYS, A.J.; ROYLE, N.J.; WILSON, V.; WONG, Z. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. **Nature**, London, v.332, p.278-281, 1988.
- JULIANO, A.B.; NAREDO, M.E.B.; JACKSON, M.T. Taxonomic status of *Oryza glumaepatula* Steud. I Comparative morphological studies of New World diploids and Asian AA genome species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.45, p.197-203, 1998.
- KALISZ, S; VOGLER, D.W.; HANLEY, K.M. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. **Nature**, London, v.430, p.884-887, 2004
- KHUSH, G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p.25-34, 1997.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.15, p.65-95, 1984.
- MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação *in situ*. **Instituto de Pesquisas Florestais**, Piracicaba, v.35, p.71-78, 1987
- MORAN, G.F.; HOPPER, S.D. Conservation of the genetic resources of rare and widespread eucalypts in remnant vegetation. In: SAUNDERS, D.A.; ARNOLD, G.W.; BURBRIDGE, A.A.; HOPKINS, A.J.M. (Ed.). **Nature conservation: The role of remnants of native vegetation**. Surrey: Beaty, 1987. 410p.
- MORISHIMA, H.; BARBIER, P. Mating system and genetic structure of natural populations in wild rice *Oryza rufipogon*. **Plant Species Biology**, v.5, p.31-39, 1990.
www.bleckwellplantsci.com>

MORISHIMA, H.; MARTINS, P.S. **Investigations of plant genetic resources in Amazon Basin with emphasis on the genus *Oryza***. Mishima Japan: The Monbusho International Scientific Research Program, 1994. 100p.

NAGATO, Y. Inheritance of morphological characters. In: MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. (Ed.). **Science of the rice plant genetics**. Tokyo:Food and Agriculture Policy Research center, 1997. p.252-340.

NAGARAJU, J.; KATHIRVEL, M.; KUMAR, R.R.; SIDDIQ, E.A.; HASNAIN, S.E. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.99, n.9, p.5836-5841, 2002.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York:Columbia University Press, 1987. 512p.

OKA, H.I. **Origin of cultivated rice**. Tokyo:Elsevier, 1988. 254p.

OKA, H.I.; MORISHIMA, H. Variations in the breeding systems of wild rice *Oryza perennis*. **Evolution**, Lancaster, v.21, p.249-258, jun., 1967.

OLIVEIRA, G.C.X. Variabilidade ecológica e genética em espécies brasileiras de *Oryza*. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 8., 1991, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1991. p.15-16.

OLIVEIRA, G.C.X. **Padrões de variação fenotípica e ecologia de *Oryzae* (Poaceae) selvagens da Amazônia**. Piracicaba, 1993. 303p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, G.C.X. Geographic distribution of wild *Oryza* species in Brazil. In: MORISHIMA, H.; MARTINS, P.S. (Ed.). **Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza***: Report of 1992/93 Amazon Project. Mishima, Japan: The Monbusho International Scientific Research Program, 1994. p.10-15.

OLIVEIRA G.C.X. **A molecular phylogenetic analysis of *Oryza* L. based on chloroplast DNA sequences**. 2002, 283p. Thesis (PhD). Washington University, Saint Louis, 2002.

OLUFOWOTE, J.O.; XU, Y.; CHEN, X.; PARK, W.D.; BEACHELL, H.M.; DILDAY, R.H.; GOTO, M.; MCCOUCH, S.R. Comparative evaluation of within -cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, Ottawa, v.40, n.3, p.370-378, 1997.

PEATKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, Oxford, v.4, p.347-354, 1995.

QUESADA, T.; LOBO, J.; ESPINOSA, A.M. Isozyme diversity and analysis of the mating system of the wild rice *Oryza latifolia* Desv. in Costa Rica. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.49, n.6, p.633-643, 2002.

RANGEL, P.H.N. Origem e evolução do arroz. In: CURSO INTERNACIONAL DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE ARROZ. Goiânia:EMBRAPA, 16-27 março, 1998. 4p.

RAVI, M.; MAHESWARAN, M. Molecular marker based varietal profiling and monitoring in rice (*Oryza sativa* L.). **Manila: Food security and environment in the new millennium**. 2001. p.279.

REIS, M.S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius)**. Piracicaba, 1996. 210p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. 2nd ed. London: Chapman & Hall. 1990. 529p.

SHASHIDHAR, H.E.; SHARMA, N.; ASHOKA, M.; TOORCHI, M.; HITTALMANI, S. DNA markers associated with maximum root length in rice (*Oryza sativa* L.) applicable across mapping populations and straight varieties. **Manila: Food security and environment in the new millennium**. 2001. 285p.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: **Biotecnologia na agricultura e agroindústria**. Guaíba:Agropecuária, 2001. p.25-74.

SOUZA, A.P. de. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis:Fundação MT, 2001. p.939-965.

TANG, Ling Hwa; MORISHIMA, H.; TANG, L.H. Genetic characterization of weedy rice and the inference on their origins. **Breeding Science**, Tokyo, v. 47, n. 2, p. 135-160, 1997.

TALAG, J.D.; RAMANANTSOANIRINA, A.; BRAR, D.S.; JONES, M. Polymorphism among Asian rice (*Oryza sativa* L.) and African rice (*O. Glaberrima*) species as detected through microsatellite markers. **Philippine Journal of Science**, Manila, v.25, n.1, p.56, 2000.

VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREINER, N.B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revised. **Genetics**, Austin, v.133, p. 737-749, 1993.

VAUGHAN, D.A. **The genus *Oryza* L.**: current status of taxonomy. Manila:IRRI, 1989. 21p. (Research Paper Series, 138).

VAUGHAN, D.A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, n.6, p.139-146, 2003. Disponível em: www.Current-opinion.com Acesso em: 18 Jan. 2004.

VEASEY, E.A. **Estrutura genética de populações de espécies selvagens brasileiras de *Oryza* baseada em caracteres morfofisiológicos e isoenzimáticos**. Relatório apresentado à FAPESP, jun. 2001. 57p.

VEASEY, E.A. **Estrutura genética de populações de espécies selvagens brasileiras de *Oryza* baseada em caracteres morfofenológicos e isoenzimáticos.** Relatório apresentado à FAPESP, jul. 2002. 60p.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.15, p.53-60, 1992

VOGLER, D.W.; KALISZ, S. Sex among flowers: the distribution of plant mating systems. **Evolution**, Lancaster, v.55, n.1, p.202-204, 2001.

WATANABE, Y. Phylogeny and geographical distribution of genus *Oryza*. In: MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. **Science of the rice plant genetics**. Tokyo:Food and Agriculture Policy Research Center, 1997. p.29-39.

WEIR, B.S.; BASTEN, C.J. Sampling strategies for DNA sequence distance. **Biometrics**, Washington, v.26, p.551-582, 1990.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v.15, p.323-354, 1951.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, Lancaster, v.19, p.395-420, 1965.

WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Gene Genetic**, v. 241, p.225-235, 1993.

ZHAO, D.; PEI, A.P.; ZHANG, W.X.; ZHAO, D.L.; PEI, A.P.; ZHANG, W.X. Restudy of ancient cultivated rice from Bashidang site in Lixian Country, Hunan Province. **Chinese Journal of Rice Science**, v.14, n.3, p.139-143, 2000. www.cabi-publishing.org

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores de RAPD e SSR.** Piracicaba 2002. 130p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

2 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Oryza glumaepatula* STEUD. DETECTADAS POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

Resumo

O conhecimento da estrutura de populações naturais e sua diversidade genética é um dos temas centrais no estabelecimento de práticas estratégicas para conservação *in situ* e *ex situ*, e na condução de expedições de coletas para bancos de germoplasma. O uso de marcadores microssatélites tem dado grande contribuição para estes estudos especialmente em populações com baixa diversidade genética ao nível de DNA. Neste estudo foram investigadas onze populações de *Oryza glumaepatula*, com oito locos de microssatélites. O principal objetivo deste estudo foi analisar a variação genética dentro e entre populações, estimar o fluxo gênico e parâmetros da estrutura genética entre as populações. A diversidade genética estimada proporcionou os seguintes parâmetros: média de 10 alelos/loco polimórfico, 77,3% de locos polimórficos em média, H_o (heterozigosidade observada) = 0,091 e H_e (diversidade gênica) = 0,393. As estatísticas F detectadas pelos locos de microssatélites foram: $F_{ST} = 0,491$ (e $R_{ST} = 0,608$), $F_{IS} = 0,780$ e $F_{IT} = 0,888$. Nenhuma população foi encontrada em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Concordando com estas observações, a taxa média de cruzamento aparente estimada ($\bar{t}_a = 0,124$) indica um sistema de cruzamento misto com tendência a autogamia. Um pequeno valor para o fluxo gênico também foi detectado ($N_m = 0,259$ e $0,161$ para o F_{ST} e R_{ST} , respectivamente). As populações desta espécie não estão estruturadas no espaço ($r = 0,03$). Os resultados indicaram que as populações de *O. glumaepatula* não eram homogêneas com respeito à heterozigosidade observada (H_o), diversidade gênica (H_e), número de alelos privados e taxa de cruzamento. A população do Rio Xingu apresentou os mais elevados índices de heterozigosidades ($H_o = 0,233$ e $H_e = 0,369$), taxa aparente de cruzamento ($t_a = 0,459$) e o mais baixo índice de fixação ($f = 0,371$). O elevado nível de diferenciação genética entre as populações e o elevado número de alelos privados sugere que a amostragem deve ser conduzida em um grande número de populações desta espécie para atividades de conservação.

Palavras-chave: SSR, diversidade genética, arroz selvagem, fluxo gênico, sistema reprodutivo

GENETIC STRUCTURE OF BRAZILIAN *Oryza glumaepatula* STEUD. POPULATIONS DETECTED WITH MICROSATELLITE MARKERS

Abstract

The knowledge of the genetic structure of natural populations and their genetic diversity is one of the issues in establishing strategies for *in situ* and *ex situ* conservation practices and conducting germplasm collection expeditions. The use of microsatellite markers has contributed greatly to these studies, especially in populations with low genetic diversity at the DNA level. In this study, 11 populations of *Oryza glumaepatula* from Brazil were investigated with eight microsatellite loci. The aim of this study was to analyze the genetic variation within and among populations, estimating gene flow and genetic structure parameters among populations. Estimated genetic diversity provided the following parameters: average number of 10.0 alleles per polymorphic locus; 77.3% polymorphic loci; observed heterozygosity of 0.091 and gene diversity of 0.393. F-statistics were: $F_{ST} = 0.491$ (and $R_{ST} = 0.608$), $F_{IS} = 0.780$ and $F_{IT} = 0.888$. No population was in Hardy-Weinberg equilibrium. In agreement with these observations, the estimated apparent outcrossing rate ($\bar{t}_a = 0.124$) indicated a mixed mating system with predominance of autogamy. Also, low gene flow values ($N_m = 0.259$ and 0.161 for F_{ST} and R_{ST} , respectively) were detected. The populations were not spatially structured ($r = 0.03$). Results indicated that the *O. glumaepatula* populations were not homogeneous with respect to observed heterozygosity (H_o), gene diversity (H_e), number of private alleles and outcrossing rate. The Xingu's river population had the highest heterozygosity index ($H_o = 0.233$ and $H_e = 0.369$), the highest apparent outcrossing rate ($t_a = 0.459$) and the lowest fixation index ($f = 0.371$). The high level of genetic differentiation among populations and the high number of private alleles suggest that sampling should be conducted in a large number of populations of this species for conservation activities.

Keywords: SSR, gene diversity, wild rice, gene flow, mating system

2.1 Introdução

As espécies selvagens representam um importante reservatório gênico para o melhoramento. Muitas espécies nativas do gênero *Oryza* têm sido utilizadas como fonte de genes nos programas de melhoramento do arroz cultivado (*Oryza sativa*) desde que o pool gênico seja compatível. No caso das espécies asiáticas, essas já estão sendo utilizadas como fontes de resistência no combate de pragas e doenças (BRAR; KHUSH, 1997). A espécie selvagem *O. glumaepatula* apresenta o mesmo grupo genômico AA de *Oryza sativa*, e apesar de possuir algum nível de incompatibilidade estudos vêm sendo conduzidos para utilizá-la como fonte de genes no melhoramento do arroz cultivado brasileiro. As populações selvagens desta espécie são hidrófilas (crescendo no leito e margens dentro dos rios). *O. glumaepatula* é uma espécie predominantemente autógama, possui hábito de crescimento anual ou bianual, dependendo de sua localização geográfica. Existe uma séria preocupação na localização das áreas de ocorrência desta espécie, pois muitas se encontram em cerrados brasileiros em locais com risco de extinção. Para se dispor deste germoplasma como fonte de genes para exploração em futuros programas de melhoramento é necessário implementar estratégias efetivas de preservação *in situ* e *ex situ*. Para isto necessita-se de conhecimentos em torno de sua história de vida, demografia e de suas características genéticas como a estrutura da população, nível de diversidade entre e dentro das populações, frequência alélica, fluxo gênico, número de alelos privados, modo de reprodução, etc.

O principal objetivo do presente estudo foi analisar a diversidade genética entre populações, estimar o fluxo gênico e a estrutura genética de onze populações de *O. glumaepatula* provenientes de diferentes locais do Brasil utilizando marcadores microsatélites.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão de literatura

O gênero *Oryza* é pequeno, inclui apenas 23 espécies, e é marcado pela diversidade ecológica das adaptações de suas espécies. *Oryza glumaepatula* é uma das 21 espécies selvagens relativas ao gênero, possui genoma AA, sendo encontrada em várias partes da América Latina desde 23°N em Cuba até 23°S no Brasil (VAUGHAN; MORISHIMA; KUDOWAKI, 2003). No

Brasil as populações de *O. glumaepatula* são encontradas em várias regiões desde a Amazônia, Pantanal Matogrossense até bacias hidrográficas menores dos Estados de Goiás, Tocantins e Roraima (OLIVEIRA, 1993; OLIVEIRA, 1994; BRONDANI et al., 2002).

Uma série de estudos indicou que *O. glumaepatula* é uma espécie autógama (AKIMOTO; SHIMAMOTO; MORISHIMA, 1998; BUSO; RANGEL; FERREIRA, 1998; GE et al., 1999) e que a estrutura genética das populações naturais está intimamente associada aos caracteres da história de vida da espécie (AKIMOTO; SHIMAMOTO; MORISHIMA, 1998). Estes autores verificaram ainda que *O. glumaepatula* possui populações com ciclo anual ou bianual dependendo de sua localização geográfica. Portanto, existe uma séria preocupação na localização das áreas de ocorrência desta espécie, pois muitas se encontram em cerrados brasileiros ameaçados, com o intuito de implementar as estratégias de conservação das reservas genéticas com risco de extinção (BRONDANI et al., 2002).

Plantas autógamas possuem tendência a serem mais homogêneas dentro de populações e mais diferenciadas entre populações, com o risco de que a fixação em um alelo específico possa conferir pouca ou nenhuma flexibilidade em resposta as mudanças ambientais. Esta fixação do alelo numa situação mais dramática pode causar a completa extinção da espécie ou população (RICHARDS, 1986, 1997; HEDRICK, 2001; FRANKHAM, 2003). Por outro lado, sob condições de ambiente favoráveis estas plantas podem apresentar um hábito agressivo estabelecendo-se rapidamente no local (típico de plantas daninhas) (HOLSINGER, 2000). Em relação à conservação este tipo de espécie necessita de cuidados especiais, pois quanto maior o número de populações identificadas maiores serão as chances na conservação dos diferentes alelos resultando numa preservação de diversidade mais eficiente.

Igualmente importante é o teste das frequências alélicas das populações quanto ao desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como se existe algum fator evolutivo que possa estar interagindo para causar os desvios. Assim, estimativas rápidas e precisas do padrão de distribuição e da dinâmica da variabilidade genética são necessárias. Estas informações deverão otimizar a conservação das reservas genéticas da espécie (MORAN; HOPPER, 1987).

Os marcadores moleculares têm sido usados em *O. glumaepatula* e uma série de outras espécies de *Oryza* para estudos de caracterização de germoplasma, evolução, filogenia e genética de populações. Buso; Rangel e Ferreira (1998) utilizaram marcadores isoenzimáticos e RAPD para estimar parâmetros genéticos de quatro populações de *O. glumaepatula* e obtiveram valores elevados para a diferenciação entre populações, concluindo que o padrão de distribuição da

variação genética estava de acordo com as expectativas para uma espécie autógama. Doi et al. (1996), ao analisar os acessos de genoma AA das espécies do gênero *Oryza*, concluíram que *O. glumaepatula* seria um subtipo de *O. rufipogon*. Mas Ge et al. (1999) e Oliveira (2002) estudando populações de *O. rufipogon* da China e do Brasil com marcadores RAPD, verificaram que as populações chinesas apresentavam um polimorfismo maior do que as populações brasileiras tanto em nível de população quanto em nível regional. Para os autores, este fator é devido ao sistema reprodutivo contrastante entre as populações brasileiras e chinesas, bem como fluxo gênico do arroz cultivado anual para as populações perenes da China. Eles concluíram que a maior diferenciação entre populações chinesas e brasileiras concorda com o recente tratamento que tem sido atribuído às populações Americanas de *O. rufipogon* considerando-as uma espécie separada com a denominação de *O. glumaepatula*. Doi et al. (2000) estudando a variação mitocondrial, cloroplastidial e do DNA nuclear, sugeriu que *O. glumaepatula* possui múltiplas origens. Por outro lado, Bautista et al. (2001) estudando as relações filogenéticas entre o arroz cultivado e o arroz selvagem concluiu que *O. glumaepatula* estava intimamente relacionada aos grupos de *O. sativa* e *O. glaberrima*. Já Buso; Rangel e Ferreira (2001), usando RAPD e seqüências específicas de DNA citoplasmático e nuclear, obtiveram árvores filogenéticas a partir de análises fenéticas e cladísticas a partir das quais verificaram que *O. glumaepatula* era uma espécie separada distinta de *O. rufipogon*, e que as espécies americanas diplóides e tetraplóides divergiram de *O. sativa* – *O. nivara* (genoma AA), CC e BBCC, respectivamente a 20 milhões de anos. Assim, isto está em desacordo com Chang (1985) que afirma que *O. glumaepatula* é considerada ser derivada de ancestrais que pré-datam a divisão do continente de Gondwana.

Entre os marcadores moleculares existentes os microsatélites são os que ocorrem em maior frequência e se encontram distribuídos ao acaso (WU; TANKSLEY, 1993). As taxas de mutação dos microsatélites são elevadas (10^{-2}) quando comparadas às taxas de mutação de ponto que estão na ordem de 10^{-9} e 10^{-10} (HANCOCK, 2000). Acredita-se que os mecanismos responsáveis pela geração de variação no comprimento das repetições em tandem sejam dois: a recombinação e o escorregamento da DNA polimerase durante a replicação. Espera-se que a recombinação gere ampla distribuição de variações no comprimento numa taxa que pode ser elevada, como 5×10^{-2} (JEFFREYS et al., 1998). Assim, ao comparar seqüências espera-se encontrar pouca correlação entre as magnitudes das diferenças acumuladas no comprimento e no número de eventos de crossing-over desigual que as produzem. Já a replicação por escorregamento que ocorre durante a replicação do DNA parece favorecer pequenas mutações de

ponto nas repetições em tandem (VALDES; SLATKIN; FREINER, 1993) a uma taxa aproximada de 10^{-3} e 10^{-4} (EDWARDS et al., 1992). Atualmente, os microssatélites têm sido altamente indicados e usados em estudos de genética de populações de plantas selvagens devido a sua reprodutibilidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), e por serem geneticamente mais informativos para este tipo de estudo (BRONDANI et al., 2002). O uso de microssatélites tem proporcionado grande contribuição, em estudos de genética de populações, na obtenção das estimativas dos parâmetros genéticos, especialmente no caso de populações com baixa diversidade ou diversidade genética não detectada por outros marcadores ao nível de DNA (PEATKAU et al., 1995).

De acordo com Morgante et al. (2002), a distribuição dos microssatélites é função da dinâmica, da história da evolução do genoma e características seletivas. Entre as espécies de plantas estudadas, a frequência total dos microssatélites estudados apresentou relação inversa entre o tamanho do genoma e a proporção de DNA repetitivo, mas permaneceu constante na porção transcrita do genoma. Isto indica que a maioria dos microssatélites reside em regiões que pré-datam a recente expansão do genoma em plantas. Assim sendo a abundância de microssatélites em regiões transcritas e outras regiões de cópia única do genoma fazem deste uma das mais atrativas classes de marcadores genéticos para realizar análises em plantas.

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Populações, Amostragem e Extração de DNA

Onze populações de *O. glumaepatula* provenientes da coleção de germoplasma de arroz selvagem do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, foram estudadas. As populações foram selecionadas de seis localidades no Brasil: sete de rios da bacia amazônica no Estado do Amazonas e Roraima [(1) Rio Purus, (2) Rio Solimões, (1) Rio Japurá, (1) Rio Tapajós, (1) Rio Negro e (1) Rio Branco], uma do Estado do Mato Grosso (Rio Xingu, também pertencente à bacia amazônica) e três do Estado do Mato Grosso do Sul da bacia do Rio Paraguai [(2) Rio Paraguai e (1) do Rio Taquari] (Figura 1, Tabela 1). Para formar o bulk de sementes, de cada população, foram amostradas de duas a três sementes de cada planta, coletada na natureza, até formar um conjunto de 50 sementes. Estas sementes foram germinadas no laboratório em câmaras de germinação a uma temperatura de 27°C

no escuro (Figura 2a). As sementes germinadas foram transplantadas para vasos em casa de vegetação onde cresceram até o estágio adulto (Figura 2b). Cada população foi composta de 30 indivíduos.

Figura 1 - Mapa mostrando a distribuição das onze populações brasileiras de *Oryza glumaepatula*

Tabela 1 - Origem das populações de *O. glumaepatula* avaliadas

População	Bacia hidrográfica	Rio	Lago	Localização Geográfica
XI-1	Xingu	Xingu	Piulaga	12°14' S – 53°35'W
NE-18	Branco	Branco	-	01°53' S – 61°22'W
SO-4	Solimões	Solimões	Calado	03°16' S – 60°13'W
PU-1	Purus	Purus	-	03°49' S – 61°25'W
PG-1	Paraguai	Paraguai	Pantanal	19°01' S – 57°30'W
PG-4	Paraguai	Taquari	-	19°15' S – 57°13'W
TA-1	Tapajós	Tapajós	-	02°26' S – 54°42'W
NE-26	Negro	Carabinani	-	01°54' S – 61°23'W
JA-4	Japurá	Japurá	Cuiucuiú	02°02' S – 65°07'W
PG-2	Paraguai	Paraguai	Pantanal	19°00' S – 57°41'W
SO-6	Solimões	Solimões	Manacapuru	03°11' S – 60°47'W

Figura 2 - Foto ilustrando a germinação (a), o plantio e altura do transplante de *Oryza glumaepatula* (b)

2.2.2.2 Amplificação dos locos SSR

O DNA genômico total foi extraído de folhas adultas liofilizadas utilizando o procedimento do método CTAB de acordo com Hoisington et al. (1994), simplificado por Karasawa et al. (2003). O processo de simplificação do método CTAB consistiu principalmente na retirada do NaOAc (Acetato Óxido de Sódio) e de todas as etapas subsequentes. Depois de extraído, o DNA foi quantificado em gel de poliacrilamida utilizando como padrão λ com amplitude de 10, 20, 40 e 80 ng, respectivamente da direita para a esquerda, e coloração de nitrato de prata (BASSAM, CAETANO-ANOLLES; GRESSHOF, 1991)(Figura 3a) e depois diluído e adequado para a concentração de 30 ng/ μ L (Figura 3b), sendo utilizado como padrão λ de 10, 20 e 30 ng, respectivamente da direita para a esquerda.

Figura 3 - Quantificação (a) e diluição (b) do DNA das populações de *Oryza glumaepatula*

Foram selecionados oito pares de primers (OG-22, OG-26, OG-27, OG-29, OG-36, OG-39, OG-42 e OG-63) desenvolvidos por Brondani et al. (2001) para amplificação dos locos de *O. glumaepatula* deste estudo. Todos os pares de primers foram submetidos primeiro ao programa básico de anelamento para reações de PCR descrito por Brondani et al. (2001). Os primers que não amplificaram satisfatoriamente foram submetidos a novos ciclos de amplificação com temperaturas de anelamento superiores e inferiores. Os pares de primers OG-26 e OG-29 amplificaram satisfatoriamente à temperatura de 60°C, e OG-27 amplificou a 54°C (Tabela 2, Figura 4).

Em cada reação de PCR foram utilizados 30 ng de DNA genômico em 12 μ L de volume, o qual continha 0,3 μ M de cada primer, 0,25 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris-HCl e 0.6 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Gibco BRL). As reações foram realizadas no termociclador Primus 96 com 4 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 30 ciclos de (1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 56°C ou 60°C, 1 min de elongação a 72°C), e extensão final de 5

minutos a 72°C. A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel vertical de poliacrilamida nativa a 120 V por 3 horas. Os fragmentos amplificados foram visualizados utilizando a coloração de nitrato de prata (BASSAM, CAETANO-ANOLLES; GRESSHOF, 1991).

Figura 4 - Locos de microssatélites utilizados no estudo da estrutura genética das populações

2.2.2.3 Análise estatística dos dados

As frequências genotípicas (Tabela 2) obtidas a partir da interpretação do padrão de bandas nos géis foram submetidas ao teste exato de Fisher considerando o equilíbrio de Hardy-Weinberg conforme definido por Weir (1996), utilizando o programa TFGA (MILLER, 1997). As estimativas das estatísticas F foram realizadas considerando o modelo aleatório conforme definido por Weir (1996) onde as populações amostradas foram consideradas representativas para a espécie e com história evolutiva comum. Estimaram-se as frequências alélicas e genotípicas, o número de alelos por loco (A), a percentagem de locos polimórficos, a heterozigosidade observada (H_o), diversidade gênica (H_e), e as estatísticas F de Wrigth (F_{IS} , F_{ST} e F_{IT}) utilizando o programa GDA (LEWIS e ZYAKIN, 2000).

O processo de mutação no loco de microssatélites não é linear sob as expectativas do modelo infinito de alelos com baixas taxas, portanto, utilizou-se o parâmetro análogo do F_{ST} (SLATKIN, 1995), o R_{ST} , desenvolvido especificamente para dados de microssatélites. Para o cálculo do R_{ST} utilizou-se o programa $R_{ST}Cal$ (Goodman, 1997) e o N_m foi estimado a partir dos valores obtidos pelo R_{ST} e F_{ST} . Os dendrogramas foram construídos a partir das distâncias genéticas da matriz de Nei pelo critério de agrupamento UPGMA, com auxílio do programa TFGA (MILLER, 1997). A estabilidade de cada nó foi testada pelo método de re-amostragem utilizando o programa BOOD (Coelho, 2001) com 10000 reamostragens.

O padrão de variação espacial entre a distância genética da matriz de Nei (NEI, 1978) e a distância da matriz geográfica (menor distância entre dois pontos do mapa) foram analisados entre populações utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r) do programa NTSYS-pc (ROLF, 1992). A significância destas correlações foi testada pela estatística Z de Mantel (Mantel, 1967) utilizando 1000 permutações. As taxas de cruzamento aparente foram estimadas considerando-se a relação $t_a = (1 - F_{IS}) / (1 + F_{IS})$ que é válida somente se a população está em equilíbrio com respeito ao sistema reprodutivo. Também foi identificada a presença de alelos privados utilizando-se o programa GDA (LEWIS; ZYAKIN, 2000).

Tabela 2 - Frequências alélicas dos oito locos de microssatélites estimados a partir de 310 indivíduos de onze populações de *Oryza glumaepatula*

Loco	Alelo	Populações										
		XI	Ne-18	SO-4	PU-1	PG-1	PG-4	TA-1	Ne-26	JA-4	PG-2	SO-6
OG22	165	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000
	175	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000
	180	0,017	0,240	0,224	0,650	0,000	0,000	0,100	1,000	0,000	0,000	0,000
	181	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	182	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	183	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	184	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	185	0,717	0,760	0,621	0,200	0,467	0,500	0,750	0,000	0,000	0,000	0,000
	186	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	187	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	188	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	189	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	190	0,000	0,000	0,155	0,017	0,150	0,367	0,050	0,000	0,000	0,306	0,000
	195	0,267	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,472	0,000
	205	0,000	0,000	0,000	0,000	0,183	0,067	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000
	210	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000
	235	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000
260	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,778	
265	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,222	
OG26	95	0,567	0,483	0,350	0,800	0,000	0,000	0,457	0,000	0,000	0,000	1,000
	100	0,000	0,483	0,583	0,200	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	105	0,000	0,000	0,067	0,000	0,133	0,600	0,543	0,000	0,000	0,500	0,000
	110	0,000	0,000	0,000	0,000	0,867	0,400	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000
	120	0,433	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
OG27	120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056
	130	0,017	0,000	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,667
	135	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000
	140	0,033	0,000	0,000	0,000	0,067	0,050	0,029	0,000	0,000	0,000	0,056
	145	0,000	0,733	0,033	0,000	0,017	0,083	0,000	0,000	0,000	0,083	0,111
	150	0,850	0,000	0,267	0,828	0,283	0,217	0,000	0,000	0,000	0,250	0,111
	155	0,067	0,000	0,067	0,000	0,300	0,267	0,250	0,000	0,000	0,222	0,000
	160	0,033	0,000	0,050	0,103	0,000	0,217	0,515	0,000	0,000	0,056	0,000
	165	0,000	0,083	0,483	0,034	0,117	0,100	0,088	0,000	0,000	0,000	0,000
	170	0,000	0,083	0,100	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000	1,000	0,056	0,000
	175	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	1,000	0,000	0,000	0,000
	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
185	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	
190	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	
200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
210	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	

Tabela 2 - Frequências alélicas dos oito locos de microssatélites estimados a partir de 310 indivíduos de onze populações de *Oryza glumaepatula*

(conclusão)												
Loco	Alelo	Populações										
		XI	Ne-18	SO-4	PU-1	PG-1	PG-4	TA-1	Ne-26	JA-4	PG-2	SO-6
OG29	80	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167
	85	0,467	0,000	0,000	0,167	0,133	0,117	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	90	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,472	0,267
	95	0,000	0,100	0,000	0,067	0,167	0,000	0,083	1,000	0,000	0,056	0,000
	100	0,533	0,150	0,200	0,267	0,417	0,233	0,653	0,000	0,000	0,028	0,400
	102	0,000	0,000	0,483	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	105	0,000	0,100	0,167	0,483	0,100	0,433	0,111	0,000	0,000	0,111	0,000
	110	0,000	0,483	0,150	0,017	0,000	0,100	0,153	0,000	1,000	0,278	0,167
	120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,183	0,100	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000
	125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
OG36	150	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	160	0,333	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	165	0,000	0,000	0,367	0,000	0,000	0,000	0,118	0,136	0,000	0,000	0,000
	170	0,000	0,300	0,000	0,033	0,000	0,000	0,044	0,000	0,000	0,000	1,000
	175	0,000	0,000	0,350	0,800	0,383	0,190	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000
	180	0,000	0,200	0,267	0,133	0,400	0,190	0,676	0,864	0,000	0,063	0,000
	185	0,000	0,167	0,000	0,000	0,133	0,534	0,132	0,000	0,000	0,500	0,000
	190	0,667	0,333	0,000	0,033	0,083	0,086	0,000	0,000	1,000	0,438	0,000
OG39	250	1,000	0,000	0,033	0,183	0,000	0,000	0,242	0,000	0,000	0,000	0,306
	255	0,000	0,000	0,150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	260	0,000	0,367	0,000	0,000	0,000	0,000	0,545	0,000	0,000	0,000	0,000
	265	0,000	0,633	0,783	0,783	0,517	0,067	0,212	0,000	1,000	1,000	0,000
	270	0,000	0,000	0,000	0,033	0,483	0,583	0,000	1,000	0,000	0,000	0,694
	275	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,350	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
OG42	420	0,900	0,776	0,467	0,000	0,917	0,967	0,771	1,000	1,000	0,000	0,294
	422	0,100	0,224	0,533	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	425	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,229	0,000	0,000	0,000	0,000
	430	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,625	0,706
	435	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,281	0,000
	440	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,094	0,000
OG63	100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,750
	110	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083
	120	0,183	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167
	125	0,000	0,067	0,000	0,000	0,017	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	130	0,533	0,000	0,893	0,966	0,150	0,183	0,000	0,000	0,000	0,483	0,000
	135	0,283	0,467	0,000	0,034	0,133	0,050	0,953	1,000	0,000	0,063	0,000
	140	0,000	0,467	0,107	0,000	0,333	0,317	0,016	0,000	1,000	0,438	0,000
	145	0,000	0,000	0,000	0,000	0,367	0,333	0,031	0,000	0,000	0,063	0,000
	150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

2.2.3 Resultados

Os oito pares de primers utilizados amplificaram 80 alelos em 310 indivíduos de 11 populações de *O. glumaepatula* aqui estudadas. Todos os primers selecionados mostraram polimorfismo. O número de alelos por loco variou de 5 a 20, sendo em média 10 alelos (Tabela 3). Este número mostrou considerável variação entre as populações, conforme pode ser verificado na Tabela 4. Na realidade, a população JA-4 foi completamente monomórfica enquanto que a população PU-1 apresentou onze alelos no loco OG-22. O material da população Ne-26, coletado no Rio Carabinani, também foi altamente monomórfico sendo detectados somente dois alelos por loco. Considerando-se a totalidade de bandas, 20% foram monomórficas nas 11 populações estudadas. As populações originadas na bacia do Rio Amazonas mostraram elevado nível de monomorfismo (32,1% dos locos foram monomórficos), seguido pelas bacias do Rio Xingú (12,5%) e do Rio Paraguai (4,2%). Estes resultados discordam dos dados obtidos por Buso et al. (1998) com base em marcadores RAPD, que obtiveram elevado grau de monomorfismo nos materiais da região do Paraguai (32% das bandas foram monomórficas) e níveis mais baixos para a região do Amazonas (16%).

Tabela 3 - Sequências dos pares de primers desenvolvidos para *Oryza glumaepatula* com o número do cromossomo (Crom.), tamanho do fragmento (pb), número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o), diversidade gênica (H_e) temperatura de anelamento (T_a)

loco	Sequências dos <i>primers</i> *	Crom.	pb	A	H_o	H_e	$T_a(^{\circ}\text{C})$
OG 22	(F) GCCATCCATTCTTACCAG (R) CACAGGTGTGGTGCTCA	12	165-265	20	0,108	0,774	56
OG 26	(F) CATGGTGCCGATTACGGT (R) CATCTCCATCGCGGTCAT	10	95-120	5	0,036	0,749	60
OG 27	(F) TCGGACGTGGCATATGA (R) CTGTTCCGAGCGAGAGT	9	120-210	16	0,075	0,866	54
OG 29	(F) GACCAGTTCACCATGCAG (R) GAGTGAGGCAGCAAGACA	1	80-125	10	0,124	0,824	60
OG 36	(F) AACGTTTCATCGGTTCTGG (R) TGCTTGCCAGGTTATTCC	4	150-190	8	0,112	0,810	56
OG 39	(F) GCGTACTAGGCCATGATA (R) TCCACGTAAGAACACTCG	3	250-275	6	0,043	0,702	56
OG 42	(F) TGCAGGCTCTGAGCTAC (R) AGAACAGATCTTGCCGTC	5	420-440	6	0,049	0,486	56
OG 63	(F) CAGGGGACAAGCACATA (R) TAGACGATGTCGAGAAGG	2	100-150	9	0,153	0,764	56
Média				10	0,088	0,748	-

*Sequências dos pares de *primers* desenvolvidos por Brondani *et al.* (2001).

Tabela 4 - Estimativas dos parâmetros genéticos baseados em oito locos de microssatélites para onze populações de *O. glumaepatula*: número médio de indivíduos amostrados por loco (N), número médio de alelos por loco (A) em ordem decrescente da parte superior para a inferior, número médio de locos polimórficos (P), heterozigosidade média observada por loco (H_o), diversidade gênica (H_e), índice de fixação (f) e taxa de cruzamento aparente (t_a)

População	N	A	P	H_o	H_e	f	t_a
PG-4	29,9	4,375	100,0	0,176	0,585	0,703	0,174
PU-1	29,8	4,000	87,5	0,071	0,328	0,787	0,119
PG-2	16,6	4,000	87,5	0,126	0,562	0,780	0,123
PG-1	30,0	3,875	100,0	0,100	0,569	0,827	0,095
TA-1	32,4	3,875	100,0	0,018	0,464	0,961	0,020
SO-4	29,6	3,500	100,0	0,054	0,527	0,898	0,054
NE-18	29,1	3,250	100,0	0,073	0,526	0,863	0,074
SO-6	16,8	2,500	75,0	0,136	0,364	0,634	0,224
XI-1	30,0	2,500	87,5	0,233	0,369	0,371	0,459
NE-26	21,6	1,125	12,5	0,011	0,030	0,628	0,229
JA-4	35,4	1,000	0,0	0,000	0,000	-	-
Média	27,38	3,091	77,3	0,091	0,393	0,750	-

Valores baixos de heterozigosidade foram observados nas 11 populações quando comparados à diversidade gênica (Tabela 4), indicando excesso de homozigotos. As estimativas dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg também foram significativas para todas as populações (Tabela 5). A população do Rio Xingú (XI-1) mostrou-se claramente diferenciada, apresentando o maior nível de heterozigosidade observada ($H_o = 0,233$), o menor coeficiente de endogamia ($f = 0,371$) e a maior taxa de cruzamento aparente ($t_a = 0,459$) (Tabela 4). Em geral, as populações não foram homogêneas em relação à diversidade gênica, com valores variando de 0,0 a 0,585, com os maiores níveis localizados nos materiais da bacia do Rio Paraguai (PG-1, PG-4, PG-2), seguidos pelas populações SO-4 e NE-18 das bacias dos Rios Negro e Solimões, respectivamente. Considerando o sistema reprodutivo, estimado através da taxa de cruzamento aparente ($\bar{t}_a = 0,124$; Tabela 4), e as taxas de cruzamento ao nível populacional (t_a), prevaleceu uma forte tendência para a autofecundação com pequeno conteúdo de cruzamentos, dependendo da população. A exceção foi dada à população XI-1 que foi intermediária, com 45,9% de cruzamento (Tabela 4). A taxa de cruzamento média obtida, $\bar{t}_a = 0,124$ concorda com os dados obtidos por Brondani et al. (2002), que foi $\bar{t}_a = 0,188$, para *O. glumaepatula*. Estes valores baixos

da estimativa $\bar{t}_a$ encontrados são uma consequência do elevado coeficiente médio de endogamia intrapopulacional detectado ($f = 0,750$, Tabela 4).

Tabela 5 – Probabilidade do teste exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco e população

Loco	XI-1	NE-18	SO-4	PU-1	PG-1	PG-4	TA-1	NE-26	JA-4	PG-2	SO-6
OG22	0,734	0,000	0,000	0,195	0,000	0,000	0,000	-	-	0,000	0,000
OG26	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	0,000	0,000
OG27	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	0,000	0,000
OG29	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	0,000	0,000
OG36	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	-	0,000	-
OG39	-	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	0,000	0,000
OG42	1,000	0,000	0,000	-	0,004	1,000	0,000	-	-	0,000	0,000
OG63	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,016	-	-	0,128	1,000

A diferenciação genética entre populações, relacionada com a variação genética total, foi muito elevada com $F_{ST} = 0,491$ e $R_{ST} = 0,608$. Estas estimativas são semelhantes e ambas significativamente diferentes de zero (Tabela 6). O número aparente de migrantes por geração baseado no R_{ST} foi de $N_m = 0,161$, que concorda com o esperado para espécies predominantemente autógamas. Este coeficiente de endogamia extremamente elevado ($F_{IT} = 0,888$) foi primeiramente causado pela endogamia intrapopulacional ($F_{IS} = 0,780$), mas a diferenciação também desempenhou um papel importante na estimativa do F_{IT} .

Tabela 6 - Estimativas das estatísticas F de Wright, R_{ST} e o número de migrantes por geração (N_m) para onze populações naturais de *Oryza glumaepatula*

	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	R_{ST}	N_{mA}	N_{mB}	$\bar{t}_a$
Todos os locos	0,888	0,491	0,780	0,608	0,161	0,259	0,124
Superior (IC 95%)	0,920	0,541	0,836	-	-	-	0,166
Inferior (IC 95%)	0,857	0,443	0,715	-	-	-	0,089

N_{mA} : baseado no R_{ST}

N_{mB} : baseado no F_{ST}

IC: 95% intervalo de confiança

As distâncias genéticas de Nei, calculadas aos pares entre populações, variaram de 0,202 a 3,411 (Tabela 7). Assim, elevado grau de similaridade foi encontrado somente entre as populações PG-1 e PG-4 e, também entre SO-4 e PU-1. Estes resultados associados ao

dendrograma (Figura 5) têm mostrado que as populações de uma mesma região não se agrupam baseadas na proximidade. De fato, a baixa correlação entre as distâncias genética e geográfica ($r = 0,03$) concorda com estes achados. O número de alelos privados detectou pontos de fluxo gênico pequeno ou ausente entre as populações. Na Figura 6 pode ser visualizado o número de alelos privados encontrados em nove das 11 populações, atingindo nas populações PU-1 oito alelos, PG-2 seis alelos e na SO-6 cinco alelos. Estes números ficam acima do número de alelos obtidos dentro de cada população que variou de 1,0 a 4,0 (Tabela 4).

Tabela 7 - Distâncias genéticas de Nei (1978) entre 11 populações de *Oryza glumaepatula*

População	XI	NE-18	SO-4	PU-1	PG-1	PG-4	TA-1	NE-26	JA-4	PG-2	SO-6
XI-1	***										
NE-18	0,784	***									
SO-4	0,804	0,521	***								
PU-1	0,811	0,988	0,289	***							
PG-1	0,785	0,673	0,688	1,082	***						
PG-4	0,815	0,732	0,854	1,408	0,202	***					
TA-1	0,664	0,450	0,849	1,360	0,617	0,559	***				
NE-26	1,630	0,885	1,248	1,771	0,928	1,057	0,821	***			
JA-4	1,231	0,525	0,921	1,848	1,053	1,211	1,601	1,371	***		
PG-2	1,530	0,943	0,902	1,050	0,727	0,843	1,530	3,411	0,680	***	
SO-6	1,224	1,235	1,931	1,526	1,575	1,590	1,455	1,849	2,628	1,853	***

Figura 5 - Padrão de divergência genética, entre as onze populações de *Oryza glumaepatula*, baseado no agrupamento de UPGMA utilizando as distâncias genéticas de Nei (1978). Dados provenientes de oito locos de microssatélites

Figura 6 - Número de alelos privados para as 11 populações de *Oryza glumaepatula*

2.2.4 Discussão

2.2.4.1 Variação genética

O conhecimento dos níveis de variação genética em plantas tem implicações imediatas sobre as estratégias ótimas de amostragem de indivíduos ou populações, na conservação e manutenção da diversidade genética do germoplasma tanto *in situ* quanto *ex situ*. Isto é particularmente verdadeiro para a *O. glumaepatula* da América do Sul, considerando que as informações em torno de sua diversidade e estrutura genética são poucas e insuficientes.

Elevados índices de diversidade genética foram encontrados nas populações brasileiras deste estudo utilizando marcadores moleculares de microssatélites ($A = 3,091$; $P = 77,3\%$; $H_e = 0,393$), apesar do seu sistema reprodutivo predominantemente autógamo. Contudo, as populações não foram homogêneas com respeito a heterozigosidades observadas (H_o), diversidade gênica (H_e), número de alelos privados e taxa de cruzamento aparente (t_a). Por essa razão, elas não podem ser consideradas uma unidade genética natural, o que tem fortes implicações nos programas de conservação *in situ* e *ex situ*. A grande diferença encontrada entre a heterozigosidade observada ($H_o = 0,091$) e esperada ($H_e = 0,393$) juntamente com a significância do teste exato de Fisher para as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram causados

predominantemente pelo sistema reprodutivo. Estes índices foram superiores aos relatados por Buso, Rangel e Ferreira (1998) ($H_o = 0,00$ a $0,025$ e $H_e = 0,00$ a $0,21$) e Akimoto, Shimamoto e Morishima (1998) ($H_o = 0,03$ e $H_e = 0,044$) com marcadores moleculares de isoenzimas, provavelmente devido ao elevado nível de heterozigosidade que pode ser detectado pelos marcadores moleculares microssatélites. Contudo, Brondani et al. (2002) utilizando microssatélites também encontrou valores baixos para estes índices ($H_o = 0,036$ and $H_e = 0,113$) com populações de *O. glumaepatula*.

Um elevado número de alelos privados foi observado, sendo que a maioria das populações apresentou de dois a quatro alelos, à exceção da população PU-1 onde foram encontrados nove alelos (Figura 5). A elevada variação no número de alelos privados pode ter ocorrido pelo fato das populações terem passado por períodos variáveis de isolamento genético durante sua recente história evolutiva.

A taxa de cruzamento aparente estimada neste estudo indica diferentes níveis de fertilização cruzada, variando de 2,2 a 45,9%, com valor médio de 12,4%. Este valor médio indica predominância de sistema reprodutivo de autofecundação com pequena taxa de cruzamentos. Estimativas semelhantes foram relatadas por Brondani et al. (2002) para populações de *O. glumaepatula* (18,8%).

O sistema reprodutivo no gênero *Oryza* é variável, variando de taxas de 100% de cruzamentos em *O. longistaminata*, proporcionado pelo seu sistema de auto-incompatibilidade que é único no gênero, a predominantemente autógama, que ocorre em *Oryza sativa* (com taxas de cruzamento $t = 0$ para algumas variedades de Indica e 3,9% em algumas variedades de Japonica), *O. glaberrima* ($t = 1 \sim 5\%$) e em *O. barthii* ($t = 3,2 \sim 19,7\%$). Existe certa dificuldade na comparação de dados da literatura por causa dos diferentes métodos que têm sido utilizados na estimativa da taxa de cruzamento. Algumas estimativas são baseadas em análises de marcadores em progênies de populações naturais (OKA; CHANG, 1961; BARBIER, 1987), outras são baseadas na relação da variância genética de caracteres quantitativos dentro e entre linha (trabalhos citados por OKA, 1988), e um terceiro método provém das estimativas indiretas de t proveniente dos valores de regressão obtidos dos valores de t obtidos por outros métodos e uma fórmula de discriminação estandarizada com valores para caracteres florais. Contudo, Oka (1988) considera todos estes métodos comparáveis. Porém, a estimativa baseada em marcadores moleculares tem se tornado um método preferido e alguns dos resultados obtidos são muito diferentes daqueles obtidos por outros métodos. Por isto, todas as estimativas antigas das

populações amazônicas de *O. glumaepatula* baseadas em regressão (em geral 40%, com valores variando de 20 a 60%) (OKA, 1988) são em média bem mais altas que os dados recentes obtidos por marcadores sugerindo que a estimativa indireta super estime os valores de t .

Isto mostra que a real distribuição da taxa de cruzamento em *O. glumaepatula* talvez seja composta de valores mais baixos que os anteriormente aceitos, indicando que o sistema reprodutivo desta espécie deve ser classificado como misto com predomínio de autofecundação. Este é um exemplo de discordância entre caracteres morfológicos e ecológicos de um lado, e evidências obtidas por ferramentas moleculares por outro lado. Os comprimentos das anteras e estigmas de *O. glumaepatula* são geralmente muito maiores que em *O. sativa*, um grupo autógamo (OLIVEIRA, 1993). Ambas as anteras e estigmas são completamente projetadas para fora durante a antese e, geralmente, as flores de uma mesma panícula não abrem ao mesmo tempo (OLIVEIRA, 1993), diminuindo provavelmente a geitonogamia, que é uma forma de autofecundação. As populações de *O. glumaepatula* ocorrem em uma grande planície submersa, de vegetação aberta onde ocorrem altas densidades e a presença do vento proporciona condições adequadas para a anemofilia. As flores podem atrair bem insetos e também serem visitadas por abelhas na Amazônia em condições naturais e por abelhas domésticas e vespas em condições experimentais (OLIVEIRA, G.C.X., dados não publicados), contudo o papel destes insetos polinizadores não tem sido avaliado. O mecanismo pelo qual um elevado conteúdo de autofecundação ocorre na presença de elementos morfológicos e ecológicos favorecendo a alogamia até o momento não está clara, mas uma possível explicação é a deiscência da antera antes da antese no momento em que o estigma está receptivo.

2.2.4.2 Estrutura genética das populações

As estimativas do F_{ST} e do R_{ST} (0,491 e 0,608, respectivamente) indicaram que pelo menos 50% da diversidade estava concentrada entre populações, informações que não surpreendem pelo fato de se tratar de espécies autógamas. Estes valores relativamente elevados possuem conseqüências diretas no planejamento das estratégias de conservação. Considerando-se um dado tamanho efetivo de população (N_e^*) fornecido pela amostragem de S populações suficientemente grandes para representar uma metapopulação, este número deve ser $S \geq 2 F_{ST} N_e^*$ (VENCOVSKY; CROSSA, 2003). Esta desigualdade assume que o número atual de populações

na natureza é grande com F_{ST} e o N_e^* desejado é o resultado de $S \geq 0,98$. N_e^* . Para muitas populações é necessário então que se considere um elevado valor para o N_e^* .

Valores baixos do parâmetro F_{ST} têm sido noticiados em populações de *O. glumaepatula* por Akimoto, Shimamoto e Morishima (1998) e Buso, Rangel e Ferreira (1998) ($F_{ST} = 0,31$) utilizando marcadores de isoenzimas. Porém, Buso, Rangel e Ferreira (1998), utilizando análise de RAPD, obtiveram valores mais elevados ($F_{ST} = 0,64$), semelhante aos valores de R_{ST} . Também Brondani et al. (2002) relatou que a subdivisão foi responsável pelo maior aumento da endogamia nesta espécie, com valores de 0,85 e 0,97 para o F_{ST} e R_{ST} , e 0,78 e 0,97 para F_{IS} e F_{IT} , respectivamente. Ge et al (1999), estudando a diversidade genética entre populações de *O. rufipogon* do Brasil (*O. glumaepatula*) e da China, verificaram que a diversidade genética entre populações diferiu entre estes continentes. A análise de variância molecular (AMOVA) dos dados de RAPD mostrou que a percentagem de diversidade genética entre as populações foi de 52,74% e 28,75% para as populações brasileiras e chinesas, respectivamente. Utilizando marcadores microsatélites, Gao (2004) observou pequena variabilidade entre populações de *O. rufipogon* originadas da China. Os níveis de diversidade e variabilidade intrapopulacionais encontrados nas populações chinesas de *O. rufipogon* foram elevados em relação às populações de *O. glumaepatula* da América do Sul. Vários são os fatores que têm sido atribuídos, entre eles a introgressão resultante de cruzamentos entre populações de arroz cultivados e arroz selvagem e as elevadas taxas de cruzamento observadas nas populações chinesas (Ge et al., 1999).

A grande diferenciação genética observada entre populações é um reflexo do sistema reprodutivo predominantemente autógamo, conforme discutido acima, reduzindo o fluxo gênico entre populações. O sistema reprodutivo e a endogamia intrapopulacional conseqüentemente elevada ($F_{IS} = 0,780$) foi o maior fator responsável para a endogamia total registrada ($F_{IT} = 0,888$). Autores como Akimoto, Shimamoto e Morishima (1998) e Buso, Rangel e Ferreira (1998) também associaram o sistema reprodutivo aos elevados valores de endogamia total nesta espécie, noticiando valores de 0,769 e 0,930 para o F_{IS} , 0,965 e 0,970 para o F_{IT} , e 0,346 e 0,310 para o F_{ST} , respectivamente.

Também foram baixos os valores estimados para o número de migrantes por geração ($N_m = 0,259$ e 0,161, respectivamente para o F_{ST} e R_{ST}). O fluxo gênico estimado pelo parâmetro do R_{ST} foi baixo e é provavelmente o mais preciso. Buso, Rangel e Ferreira (1998) observaram elevado fluxo gênico entre quatro populações de *O. glumaepatula*, mas classificaram estas como intermediárias de acordo com os três níveis de fluxo gênico baseado nas estimativas de N_m para

espécies predominantemente autógamas, descritos por Govindajaru (1989): alto ($N_m > 1$), intermediário ($0,25 \leq N_m \leq 0,999$) e baixo ($N_m \leq 0,249$). Gao (2004) também encontrou fluxo gênico limitado entre as populações chinesas de *O. rufipogon* ($N_m = 0,766$). Akimoto, Shimamoto e Morishima (1998) enfatizaram que o fluxo gênico de *O. glumaepatula* da Amazônia ocorre principalmente devido à dispersão de sementes do que pela dispersão de pólen, e que o fluxo gênico se dá principalmente na direção do fluxo do rio. De fato, a viabilidade dos grãos de pólen no gênero *Oryza* é, em geral, limitada a poucos minutos (OKA, 1988; MORISHIMA; BARBIER, 1990) o que torna impossível o fluxo gênico entre populações separadas por poucas centenas de metros. Mesmo em regiões com elevadas densidades as populações são separadas por rios, braços, lagos, canais e florestas amplas normalmente por muitas centenas de metros. Assim o pólen deve possuir um papel muito menor para o fluxo gênico global. Por outro lado, a zoocoria e a dispersão de plantas pela abscisão programada e flutuação rio abaixo devem ser os fatores responsáveis pelo N_m observado. Neste caso a taxa de cruzamento tem pequena influência, mesmo que a espécie seja totalmente alógama o N_m não deve aumentar.

A diferenciação entre populações e sua relação com as regiões geográficas pode ser observada no agrupamento de UPGMA (Figura 5) baseado nas distâncias genéticas de Nei (Tabela 7). Verificou-se que todas as 11 populações agruparam aleatoriamente e não de acordo com a sua origem geográfica. Assim, a hipótese previamente formulada que as populações geograficamente mais distantes deveriam ser também geneticamente mais diferenciadas foi descartada pelos resultados da análise de correlação, pois demonstraram não haver correlação entre as distâncias genéticas e geográficas ($r = 0,03$). Este resultado concorda com o que deve ser esperado para espécies predominantemente autógamas. Uma correlação positiva deve ser esperada considerando que as 11 populações deste estudo foram originadas de regiões diversas e ecologicamente distintas, como as regiões Amazônica, do Cerrado e Pantanal, com diferentes altitudes (0, 400 e 100 metros, respectivamente), com diferentes tipos de vegetação (floresta Amazônica, Cerrado e Pantanal), diferentes condições climáticas (equatorial úmido para a Amazônia e tropical para as outras regiões), diferentes níveis de pH e transparência das águas do rio onde estas populações ocorrem. Estes resultados indicam que a proximidade geográfica não é um indicativo de similaridade genética e, portanto, não serve de guia para o conhecimento da estrutura genética desta espécie. Estudos semelhantes com marcadores morfológicos e isoenzimas, contudo, têm separado em grupos distintos as populações de *O. glumaepatula* originadas do Pantanal Matogrossense e da região Amazônica em análises de agrupamentos (VEASEY, 2002;

ROSA; SANTOS; VEASEY, 2003). O resultado diferente fornecido pelos microssatélites dá suporte ao fato de que os microssatélites são marcadores neutros, não afetados pela seleção ou outros fatores evolucionários.

A distribuição geográfica da variação genética em *O. glumaepatula* não é simples de descrever e explicar sob um ponto de vista histórico ou adaptativo. A razão para esta aparente intensa migração entre e dentro de bacias, segue direção e tempo imprevisível. Nenhum estudo sistemático sobre a migração e dispersão do arroz selvagem da Amazônia tem sido realizado, em parte por causa da dificuldade inerente, mas umas poucas informações de várias fontes em parte desvendam a complexidade desta situação. Os principais habitats de *O. glumaepatula* são de campos e florestas inundadas sobre terrenos quaternários e bancos dos maiores rios da Bacia Amazônica e do Pantanal. Estes terrenos não são homoganeamente distribuídos ao longo dos rios, mas se concentram em alguns pequenos pedaços de terra, principalmente à esquerda dos bancos do meio da Amazônia, na confluência dos rios Japurá e Solimões, na confluência do Purus com Solimões, nas águas da nascente do Xingú, na ilha do Bananal no Araguaia, na Bacia do Guaporé, na costa Central-Norte do Amapá, na Bacia do Paraguai e nas planícies do Rio Negro. Estas são as regiões onde muitas populações de *O. glumaepatula* ocorrem, e em populações esparsas e menos densas entre elas.

A geologia dos grandes rios da Amazônia e do Pantanal é muito instável mudando num período relativamente curto. Os bancos dos rios e as planícies inundadas, que são o principal habitat de *Oryza* podem ser erodidos e rapidamente se tornarem inabitáveis. A análise de imagens de satélite revelaram que ilhas fusiformes típicas do Solimões/Amazônia, que são ricas em populações selvagens, normalmente mudam ao longo do rio como um resultado da erosão-deposição. A mobilidade geográfica pode ser a causa de ciclos rápidos de extinção e colonização da população, explicando em parte a perda da significância do coeficiente de correlação e a ausência de agrupamento de bacias de rios geograficamente contínuos, sendo que também a execução da delimitação de áreas prioritárias para conservação *in situ* torna-se mais difícil.

Devido às marés do Delta da Amazônia, muitos tributários tem seu fluxo de água revertido duas vezes ao dia. A reversão não é feita pelo rio Amazônia por si só, mas em vez disso seu nível de água aumenta e o efeito desse aumento é sentido a grandes distâncias, como na nascente do rio Tapajós, 700 metros a oeste do Atlântico (um fato comum), produzindo a reversão tributária local. Com a reversão, as populações flutuantes de arroz selvagem descem o Amazonas e entram no Tapajós, misturando o pool gênico de ambas as bacias. Isto ocorre em muitas bacias

ao leste. A migração das plantas acima é contrabalançada pela migração das plantas abaixo, como documentado por foto por Morishima e Martins (1994). Animais, peixes bentônicos e aves aquáticas carregam espiguetas em suas brânquias e penas, respectivamente, e atuam como dispersores das sementes selvagens, provavelmente ao longo dos rios a maior parte do tempo, mas menos intensivamente e lateralmente entre os “furos” (interconexões fluviais) através dos rios. A forte e adesiva arista típica desta espécie promovem um excelente mecanismo de dispersão. As tartarugas podem comer sementes de arroz em uma bacia e a defecar em outra, uma inferência baseada em observações pessoais na Bacia do Negro, onde as sementes que se encontravam no intestino de um indivíduo eram provenientes do rio Branco (Oliveira, G.C.X., dados não publicados). A mais surpreendente evidência da dinâmica da instabilidade das populações de *O. glumaepatula*, no Amazonas, é a avaliação fornecida por R. Spruce, um famoso especialista de gramíneas do século XIX, que não observou nenhuma espécie de gramínea ocorrendo ao longo do Negro (SPRUCES, 1908), exatamente 50 anos antes dos espécimes de *Oryza* desta região aparecerem nos herbários. Isto significa que ambas *O. glumaepatula* e *O. grandiglumis* colonizaram essa bacia no período intermediário, vindo de origem desconhecida. Os agentes múltiplos e direções dos movimentos de dispersão entre bacias do rio Amazonas é que permite a inserção de populações de imigrantes recentemente estabelecidos, de distância não conhecida, o que pode explicar a parcial perda de estrutura geográfica observada.

2.2.4.3 Considerações sobre a conservação

Nos programas de conservação das reservas genéticas *in situ* devem ser levados em conta características genéticas e demográficas das espécies, considerando que este fato implica na possibilidade de evolução continua e no desenvolvimento de novas estratégias adaptativas (MARTINS, 1987). A conservação genética de plantas pode ser conduzida *in situ* e *ex situ* e estas formas são diferentes, pois a primeira não é estática, i.e., ela garante a comunidade à possibilidade de evolução e coevolução com outras plantas, animais e microorganismos. É importante enfatizar que a simples proteção da vegetação natural em uma localidade como parques e reservas não é necessariamente um modo efetivo de ação da conservação genética. Para uma conservação genética efetiva é importante estar consciente da distribuição da diversidade genética destas áreas com o intuito de promover políticas que definem o que deve ser considerado e o que deve ser tomado para uso humano (KAGEYAMA; GANDARA; VENCOVSKY, 2001).

Este trabalho e a reduzida literatura sobre a estrutura genética das populações naturais de *O. glumaepatula* revelam a existência de diversidade entre e dentro de bacias de rios, bem como de alelos particulares para cada população. Estudos similares a este podem ser usados para direcionar a conservação *in situ*, na coleta e manutenção dos bancos de germoplasma, tendo em mente a conservação a curto prazo. Neste caso, o número médio de alelos proporcionou uma posição em relação à riqueza alélica (Tabela 3), e para concluir, sob o corrente estado de conhecimento as populações PG-4, no sistema do Rio Paraguai, e PU-1, na Amazônia, são prioridades na conservação. Também, o F_{ST} e o $\bar{t}_a$ (Tabelas 3 e 5) indicam que, na maioria dos casos, é necessário amostrar muitas populações. O elevado nível de diferenciação genética encontrada entre as populações somadas ao elevado número de alelos, indica que é necessário amostrar um grande número de populações para a conservação *ex situ*. O mesmo é verdadeiro para a conservação *in situ*. A conservação *in situ* por muito tempo, contudo, demanda mais estudos por períodos maiores sobre a dinâmica das populações.

2.3 Conclusões

As populações de *O. glumaepatula* não são homogêneas com respeito à heterozigosidade observada (H_o), diversidade gênica (H_e), número de alelos privados e taxa de cruzamento;

Os níveis de diversidade entre e dentro das populações são elevados;

A estimativa da taxa de cruzamento é baixa, indicando tendência de autogamia;

As populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg;

O número de migrantes por geração é baixo;

As populações desta espécie não estão estruturadas no espaço;

O elevado nível de diferenciação genética entre as populações e o elevado número de alelos privados sugere que a amostragem deve ser conduzida em um grande número de populações para conservação *ex situ* de *O. glumaepatula*.

Referências

- AKIMOTO, M.; SHIMAMOTO, Y.; MORISHIMA, H. Population genetic structure of wild *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by its life-history traits. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 1371-1381, 1998.
- BARBIER, P. **Ecological genetic study on wild rice populations from Thailand**. 1987. Master's Thesis, Nagoya University, Nagoya, Japan.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silverstaining of DNA in polyacrilamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 196, p. 80-83, 1991.
- BAUTISTA, N.S.; SOLIS, R.; KAMIJIMA, O.; ISHII, T. RAPD, RFLP and SSLP analyses of phylogenetic relationships between cultivated and wild species of rice. **Genes and Genetic Systems**, Shizuoka, v. 76, p. 71-79, 2001.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, Lund, v. 134, p. 59-71, 2001.
- BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; ZUCCHI, M.I.; MAGALHÃES, M.R.; BORBA, T.C.O.; BRONDANI, C. Análise da variabilidade genética de populações brasileiras de *Oryza glumaepatula* utilizando microssatélites. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, 1., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: EMBRAPA, 2002. p. 232-235.
- BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 107-117, 1998.
- BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Analysis of random and specific sequences of nuclear and cytoplasmatic DNA in diploid and tetraploid American wild rice species (*Oryza* spp.). **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 476-494, 2001.
- CHANG, T.T. Crop history and genetic conservation: rice – a case study. **Iowa State Journal Research**, Mississippi, v. 59, p. 425-455, 1985.
- COELHO, A.A.G. **BOOD** – avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstraps. v.3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2001.
- DOI, K.; YOSHIMURA, A.; NAKANO, M.; IWATA, N. Classification of A genome species in the genus *Oryza* using nuclear DNA markers. **International Rice Research Notes**, Manila, v. 21, p. 2-3, 1996.

DOI, K.; NOMURA, M.N.; YOSHIMURA, A.; IWATA, N.; VAUGHAN, D.A. RFLP relationships of A-genome species in the genus *Oryza*. **Journal of the Faculty of Agriculture of Kyushu University**, Kyushu, v. 45, p. 83-98, 2000.

EDWARDS, A.; HANNIBD, H.A.; JIN, L.; CASKEY, C.T.; CHAKRABORKY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, San Diego, v. 12, p. 241-253, 1992.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3nd. ed. Embrapa/Cenargen:Brasília, 1998. 220p.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendue Biologies**, Paris, v.326, p.22-29, 2003.

GAO, L.Z. Population structure and conservation genetics of wild rice *Oryza rufipogon* (Poaceae): a region-wide perspective from microsatellite variation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.13, p.1009-1024, 2004.

GAO, L.Z.; GE, S.; HONG, D.Y. Low levels of allozyme diversity and conservation genetics of common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. From Yunnan, China. **Euphytica**, Wageningen, v.124, p.273-281, 2002b.

GAO, L.Z.; SCHAAL, B.A.; ZHANG, C.H.; JIA, J.Z.; DONG, Y.S. Assessment of population genetic structure in common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. using microsatellite and allozyme markers. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.106, 173-180, 2002a.

GE, S.; OLIVEIRA, G.X.; SCHAAL, B.A.; GAO, L.Z.; HONG, D.Y. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. **Heredity**, London, v.82, p.1-7, 1999.

GOODMAN, S.J. R_{ST}Calc: a collection of computer program for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite and determining their significance. **Molecular Ecology**, Oxford, v.6, p.881-885, 1997.

GOVINDAJARU, R.D. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v.2, p.173-181, 1989

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C.(Ed.). **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press: Oxford, 2000, cap.1, p.1-9.

HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v.16, n.11, p.629-636, 2001.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. **Laboratory Protocols: CYMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Mexico: CYMMYT, 1994.

HOLSINGER, K.E. Reproductive systems and evolution in vascular plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.97, n.13, p.7037-7042, jun., 2000.

JEFFREYS, A.J.; ROYLE, N.J.; WILSON, V.; WONG, Z. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. **Nature**, London, v.332, p.278-281, 1988.

KAGEYAMA, P.; GANDARA, F.B.; VENCOVSKY, R. Conservação *in situ* de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.(Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**, Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.149-158.

KARASAWA, M.M.G.; BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A.; VENCOVSKY, R. Extração, quantificação e otimização de primers em *Oryza glumaepatula*. In: Encontro Sobre Temas de Genética e Melhoramento, 20., 2003. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/Departamento de Genética, 2003. p.92.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15), 2000. <http://www.alley.n.eeb.uconn.edu/gda/>

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research**, Baltimore, v.27, p.209-220, 1967.

MARTINS, P.S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação *in situ*. **Instituto de Pesquisas Florestais**, Piracicaba, n.35, p.71-78, 1987.

MILLER, M. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3**: A windows program for analysis of allozyme and molecular population genetic data, 1997. <http://www.public.asu.edu>.

MORAN, G.F.; HOPPER, S.D. Conservation of the genetic resources of rare and widespread eucalyptus in remnant vegetation. In: SAUNDERS, D.A.; ARNOLD, G.W.; BRIDGE, A.A.; HOPKINS, A.J.M. (Eds.) **Nature conservation**: the role of remnants of native vegetation. Surrey: Beaty, 1987.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellite are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, London, v.30, p.194-200, 2002.

MORISHIMA H, MARTINS PS. **Investigations of plant genetic resources in the Amazon Basin with emphasis on the genus Oryza**. Report of the 1992/93 Amazon Project. The Monbusho International Scientific Research Program, Japan, and FAPESP, Brazil, 1994.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v.89, p.583-590, 1978.

OKA, H.I. **Origin of cultivated rice**. Japan Scientific Societies Press, Tokyo: Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1988. 254p.

OKA, H.I.; CHANG, W.T. Hybrid swarms between wild and cultivated rice species, *Oryza perennis* and *O. sativa*. **Evolution**, Lancaster, v.15, p.418-430, 1961.

OLIVEIRA, G.C.X. **Padrões de variação fenotípica e ecologia de *Oryzae* selvagens da Amazônia.** 1993, 303p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1993.

OLIVEIRA, G.C.X. Geographic distribution of wild *Oryza* species in Brazil. In: MORISHIMA, H.; MARTINS, P.S.(Org). **Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with emphasis on the genus *Oryza*.** Report of 1992/93 Amazon Project. The Monbusho International Scientific Research Program, Japan, and FAPESP, Brazil. 1994. p. 10-15.

OLIVEIRA, G.C.X. **A molecular phylogenetic analysis of *Oryza* L. based on chloroplast DNA sequences.** 2002. 283p. Thesis (PhD), Washington University, Saint Louis.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, Oxford, v.4, p.347-354, 1995.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems.** London: George Allen & Unwin, 1986. 529p.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems.** London: George Allen & Unwin, 1997. 529p.

ROHLF, J. **NTSYS-pc:** numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.70 (software). Stony Brook, New York, 1992.

ROSA, M.S.; SANTOS, P.P.; VEASEY, E.A. Variabilidade genética entre populações de *Oryza glumaepatula* com base em caracteres morfológicos vegetativos e reprodutivos. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 11., 2003, Piracicaba. **Anais...**, Piracicaba:FEALQ, 2003. 1 CD-ROM.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v.139, p.457-462, 1995.

SPRUCE, R. **Notes of a botanist on the Amazon and Andes.** London: Macmillan, 1908.

VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREINER, N.B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revised. **Genetics**, Austin, v.133, p.737-749, 1993.

VAUGHAN, D.A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.139-146, 2003. Disponível em: www.Current-opinion.com
Acesso em: 18 Jan. 2004

VEASEY, E.A.; CARDIM, D.C.; SILVA, R.M. Diversidade genética em *Oryza glumaepatula* por meio de marcadores isoenzimáticos. In: Congresso Nacional de Genética, 48., 2002, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBG, 2002. 1 CD-ROM.

VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, Madison, v.43, p.1912-1921, 2003.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II:** Methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996.

WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular General Genetics**, Berlin, v.241, p.225-235, 1993.

3 SISTEMA REPRODUTIVO DAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Oryza glumaepatula* STEUD. DETECTADAS POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

Resumo

O conhecimento do sistema reprodutivo de populações naturais tem sido importante para implementar as práticas de manejo e conservação tanto *in situ* quanto *ex situ*. Neste estudo foram avaliadas, com oito marcadores de microssatélites, três populações de *Oryza glumaepatula* do Brasil, cada uma representada por 10 famílias e 10 indivíduos por família. O principal objetivo deste estudo foi analisar o sistema reprodutivo usando marcadores microssatélites. O número médio de alelos por loco polimórfico foi de 3, 3 e 5, respectivamente para as populações XI-1, SO-6 e PG-1. A endogamia ($\hat{F}_m$) detectada nas mães de cada população foi de 0,399, 0,846 e 0,631, respectivamente. As taxas de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$) foram de 0,160, 0,011 e 0,223, uniloco ($\hat{t}_s$) 0,078, 0,003 e 0,100, cruzamentos biparentais ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) 0,083, 0,008 e 0,123, e o coeficiente de coancestria (θ_{fam}) dentro das famílias foi de 0,711, 0,846 e 0,748 respectivamente para XI-1, SO-6 e PG-1. Os resultados indicaram divergência no sistema reprodutivo entre as populações de *O. glumaepatula* com níveis autofecundação que variaram da autogamia absoluta até taxas de cruzamento de 22,3%. Assim, o sistema reprodutivo desta espécie foi classificado como misto com predomínio de autogamia.

Palavras-chave: sistema reprodutivo, arroz selvagem, marcador molecular, *Oryza glumaepatula*

MATING SYSTEM OF BRAZILIAN *Oryza glumaepatula* STEUD. POPULATIONS DETECTED WITH MICROSATELLITE MARKERS

Abstract

The knowledge of natural populations breeding systems has been important for to implement *in situ* and *ex situ* management and conservation practices. In this study three *Oryza glumaepatula* populations from Brazil were evaluated, with eight microsatellite markers. Each population was represented with 10 families and 10 individuals per family. The aim of this study was analyze the breeding system of this species using microsatellite markers. Mean number of alleles per polymorphic loci was 3, 3 and 5, respectively for XI-1, SO-6 and PG-1 populations. Maternal endogamy ($\hat{F}_m$) detected of each population were 0.399, 0.846 and 0.631, respectively for XI-1, SO-6 e PG-1 populations. The multilocus outcrossing rate ($\hat{t}_m$) were 0.160, 0.011 and 0.223, single-locus ($\hat{t}_s$) 0.078, 0.003 and 0.100, biparental inbreeding ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) were 0.083, 0.008 and 0.123 and the coancestry coefficient within families (θ_{fam}) were 0.711, 0.846 and 0.748, respectively for XI-1, SO-6 e PG-1. These results have indicated divergence in the mating system among *O. glumaepatula* populations with inbreeding degrees varying from perfect autogamy to rates 22.3% of outcrossing. Therefore, the breeding system of this species was classified as mixed with predominance of self-fertilization.

Keywords: breeding system, wild rice, molecular marker, *Oryza glumaepatula*

3.1 Introdução

As populações de espécies nativas vêm sendo paulatinamente extintas sem que antes tenha sido avaliada a diversidade e o seu potencial na introgressão de genes de espécies cultivadas. *O. glumaepatula* é uma espécie nativa do gênero *Oryza* e pertence ao mesmo grupo genômico de *Oryza sativa*, sendo considerada uma espécie de grande potencial para o melhoramento do arroz cultivado no Brasil. Estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de avaliar a compatibilidade nos cruzamentos entre *Oryza sativa* e *O. glumaepatula*, identificar a diversidade gênica das espécies nativas bem como confirmar o sistema reprodutivo que autores como Akimoto, Shimamoto e Morishima (1998), Buso, Rangel e Fereira (1988), Ge et al. (1999) e Oliveira (2002) consideram como sendo de autogamia. Contudo, outros autores como Brondani et al. (2002) e Karasawa et al. (2004, 2005a e b) a consideram como sendo uma espécie mista com predomínio de autogamia.

Para que se possam conduzir estratégias efetivas de preservação *in situ* e *ex situ* é necessário que se conheça o sistema reprodutivo, pois a diversidade e estrutura genética das populações da espécie é função do sistema reprodutivo e da sua história de vida. Atualmente, o interesse concentra-se na espécie nativa *O. glumaepatula*, pois são necessários detalhes mais precisos a respeito do seu sistema reprodutivo para permitir melhorar as práticas de conservação *in situ* e *ex situ*, pois até o momento não se constatou trabalhos envolvendo estudos de famílias de indivíduos de qualquer que seja a população dessa espécie.

O principal objetivo deste estudo foi analisar o sistema reprodutivo em três populações de *O. glumaepatula* provenientes de três diferentes regiões geográficas brasileiras utilizando marcadores microssatélites.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão de literatura

O sistema reprodutivo tem um papel crucial na formação da composição genética das populações, pois determina a frequência dos genótipos nos indivíduos das gerações subsequentes possuindo grande influência sobre a distribuição e o conteúdo de variação genética presente entre

e dentro das populações (HAMRICK; LINHART; MITTON, 1979; HAMRICK; GOODT, 1989; BROWN, 1990) e afeta fatores evolutivos populacionais como o tamanho da progênie, o fluxo gênico e a seleção (HAMRICK, 1989). Sabe-se que vários são os fatores que podem afetar o sistema reprodutivo, tais como: tamanho e densidade da população existente, modo de polinização e viabilidade do polinizador (FRANSCSCHINELLI; BAWA, 2000), sincronia do florescimento e padrões fenológicos (HALL; WALKER; BAWA, 1996), o grau de estrutura genética da população (ENNOS; CLEGG, 1982; FRANSCSCHINELLI; BAWA, 2000) e a presença de sistema de auto-incompatibilidade (MURAWASKY; HAMRICK, 1991).

As angiospermas exibem uma grande variedade de formas de reprodução sexual (alógama, autógama ou mista) e assexual (apomítica, estolonífera, reprodução vegetativa, etc) (BARRET; SHORE, 1989). Dentre as diferentes formas de reprodução sexual, a polinização cruzada (alogamia) é a reprodução que possui maior potencial de rearranjo da diversidade genética gerando infinitas combinações (RICHARDS, 1997), as quais servem de substrato para os fatores evolutivos (BROWN, 1990) determinando a capacidade de sobrevivência das espécies ao longo das gerações (CROW; KIMURA, 1965). Entretanto, a autofecundação é comum em plantas sendo que entre as espécies, 20% autógamas absolutas e 33% intermediárias (entre autógama e alógama) apresentando sistema reprodutivo misto (KALLISZ; VOGLER; HANLEY, 2004). Em geral, as plantas perenes praticam a alogamia, enquanto a autogamia ocorre mais nas anuais; já a maioria das gramíneas são autógamas independentes do hábito de crescimento (STEBBINS, 1974). Muitas são as espécies de plantas nativas das quais ainda não se tem conhecimento em torno de sua forma de reprodução.

O gênero *Oryza* possui diferentes sistemas reprodutivos (alógamia, autógamia, misto e reprodução vegetativa) (OLIVEIRA, 2002). *O. glumaepatula* é uma das 21 espécies selvagens do gênero, de genoma $A^{gp}A^{gp}$, e é encontrada em várias partes da América Latina desde 23°N em Cuba até 23°S no Brasil (VAUGHAN; MORISHIMA; KUDOWAKI, 2003). No Brasil, as populações de *O. glumaepatula* são encontradas em várias regiões como Amazônia, Pantanal Matogrossense e bacias hidrográficas menores como as do Estado de Goiás, Tocantins e Roraima (OLIVEIRA, 1993; OLIVEIRA, 1994; BRONDANI et al., 2002). Esta espécie, composta de diversas populações, pode apresentar hábito de vida anual, bi-anual ou perene dependendo da localização geográfica (OLIVEIRA, 1993; AKIMOTO; SHIMAMOTO; MORISHIMA, 1998); cresce no leito e nas margens dos rios apresentando comportamento típico de planta daninha e, ao romper os estolões se dispersa ao longo do leito dos rios (AKIMOTO; SHIMAMOTO;

MORISHIMA, 1998) fundando novas populações ou mesmo agregando-se nas demais existentes anteriormente.

Uma série de estudos tem indicado que *O. glumaepatula* é uma espécie autógama (AKIMOTO; SHIMAMOTO; MORISHIMA, 1998; BUSO; RANGEL; FERREIRA, 1998; GE et al., 1999; OLIVEIRA, 2002). Espécies autógamas têm a tendência de serem mais homogêneas dentro das populações e mais diferenciadas entre populações, podendo formar linhagens dentro de famílias, aumentando a diferenciação genética entre famílias gerando subdivisão dentro da população, com o risco de que a fixação de alelos específicos possa conferir pouca ou nenhuma flexibilidade na resposta a mudanças ambientais. Estas espécies, num cenário mais dramático podem ser completamente extintas devido à fixação dos alelos e perda da diversidade genética (RICHARDS, 1986, 1997; HEDRICK, 2001; FRANKHAM, 2003). Por outro lado, em condições favoráveis estas plantas podem apresentar um comportamento agressivo estabelecendo-se rapidamente no local (típico de plantas daninhas) (HOLSINGER, 2000). Em relação à conservação, este tipo de espécie necessita de um cuidado especial, pois o maior número possível de populações deverá ser identificado para aumentar as chances de conservação de diferentes alelos e com isto preservar a diversidade existente na espécie com maior eficiência. Portanto, é de fundamental importância o conhecimento do sistema reprodutivo das populações espécie, pois toda a estrutura e diversidade genéticas são por ele influenciadas.

Dentro da classe de marcadores moleculares existentes, os microssatélites são os que ocorrem em grande frequência e são aleatoriamente distribuídos (WU; TANKSLEY, 1993). Possuem taxa de mutação elevada (10^{-2}) quando comparados à taxa de mutação de ponto que ocorre na ordem de 10^{-9} , e 10^{-10} (HANCOCK, 2000). Acredita-se serem dois os mecanismos responsáveis pela variação gerada no número de repetições em tandem: recombinação e replicação por escorregamento da DNA polimerase. Espera-se que a recombinação gere uma ampla distribuição na mudança dos comprimentos com taxa de 5×10^{-2} , que pode ser considerada elevada (JEFFREYS et al., 1998). Assim, na comparação de seqüências espera-se uma estreita correlação entre as diferenças de comprimento acumuladas e o número de eventos de crossing-over desiguais que o produzem. A replicação por escorregamento que ocorre durante a replicação do DNA parece favorecer pequenas mutações de ponto no número de repetições em tandem (VALDES; SLATKIN; FREINER, 1993). As taxas com que os variantes são gerados por este processo parecem ser da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} (EDWARDS et al., 1992).

Os microssatélites têm sido altamente indicados e usados nos estudos de genética de populações de plantas nativas devido à sua reprodutibilidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), por serem considerados variantes geneticamente neutros e por serem geneticamente mais informativos para este tipo de estudo (BRONDANI *et al.*, 2002), pois marcadores tradicionais muitas vezes têm fornecido estimativas estatísticas inadequadas da diversidade entre grupos de espécies devido à pequena variação existente (HEDRICK, 2001) especialmente em populações com baixa diversidade ao nível de DNA ou quando não é possível a sua detecção com outros marcadores (PAETKAU *et al.*, 1995).

3.2.2 Material e métodos

3.2.2.1 Material vegetal

Foram estudadas três populações de *O. glumaepatula*, cada uma representada por dez famílias e dez plantas por família provenientes da coleção de germoplasma do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba, SP. As populações foram selecionadas de três regiões no Brasil: SO-6 do Estado do Amazonas, bacia do Rio Amazonas (Rio Solimões); XI-1 do Estado do Mato Grosso, também pertencente à bacia do Rio Amazonas (Rio Xingú), e PG-1 do Estado do Mato Grosso do Sul, pertencente à bacia do Rio Paraguai (Tabela 1, Figuras 1 e 2). Para estudar cada população, dez plantas foram amostradas ao acaso dentro de cada população, retirando-se 15 sementes de cada uma. Essa coleta foi feita na natureza, exceto as famílias da população proveniente do Rio Xingu, cujas sementes foram colhidas das plantas mãe em casa de vegetação. As sementes foram germinadas no laboratório em câmara de germinação a 27 ± 5 °C no escuro. As sementes germinadas foram transplantadas, para sacos plásticos contendo terra, que foram colocados em tanques com água em casa de vegetação onde cresceram até o estágio adulto. Dez famílias e dez plantas por família representaram, portanto, cada população em estudo.

Tabela 1 - Origem das populações de *O. glumaepatula*

População	Bacia Hidrográfica	Rio	Lago	Coordenadas geográficas
XI	Xingú	Xingú	Piulaga	12°14' S – 53°35' W
PG	Paraguaí	Paraguaí	Pantanal	19°01' S – 57°30' W
SO	Solimões	Solimões	Manacapuru	03°11' S – 60°47' W

Figura 1 - Fotos ilustrando as populações de *Oryza glumaepatula* utilizadas no estudo de sistema reprodutivo, da esquerda para a direita Solimões, Paraguaí e Xingú, respectivamente Figura 2 - Localização geográfica das populações maternas de *Oryza glumaepatula*

3.2.2.2 Análise por microsatélites

O DNA genômico total foi extraído de folhas de plantas adultas usando o método CTAB proposto por Hoisington et al. (1994) simplificado por Karasawa et al. (2003), cuja simplificação consistiu principalmente da exclusão do acetato óxido de sódio (NaOAc) e de todas as etapas subseqüentes. Após a extração do DNA, este foi quantificado utilizando-se gel de poliacrilamida a 4% e coloração com nitrato de prata (BASSAM, CAETANO-ANOLLES, GRESSHOF, 1991).

Oito pares de *primers* desenvolvidos por Brondani et al. (2001) para *O. glumaepatula* foram selecionados para amplificação neste estudo: OG-22, OG-26, OG-27, OG-29, OG-36, OG-39, OG-42 e OG-63. Todos os *primers* foram primeiro submetidos ao programa básico de amplificação com temperatura de anelamento de 56°C, de acordo com o descrito por Brondani et al. (2001). Os *primers* que não amplificaram satisfatoriamente em todas as populações foram submetidos a novos ciclos de amplificação com temperaturas de anelamento maiores e menores (Tabela 2, Figura 3).

Para cada reação de PCR foram utilizados 30 ng de DNA genômico em 12 µL de volume contendo 0.3 µM de cada *primer*, 0.25 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM Tris-HCl e 0.6 unidades da enzima Taq DNA polymerase (Gibco BRL). As reações foram realizadas no termociclador Primus 96 com 4 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 30 ciclos de (1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 56°C ou 60°C, 1 min extensão a 72°C), seguido pela extensão final de 5 minutos a 72°C. Realizou-se a eletroforese dos produtos amplificados, a 120V por 3 horas, em gel vertical de poliacrilamida 6% não desnaturante. Os fragmentos amplificados foram visualizados através da coloração com nitrato de prata (BASSAM; CAETANO-ANOLLES; GRESSHOF, 1991).

Tabela 2 - Sequências dos pares de *primers* dos microssatélites desenvolvidos para *Oryza glumaepatula* com o número do cromossomo (crom), tamanho do fragmento (pb), número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o) e temperatura de anelamento (T_a)

loco	Sequências dos <i>primers</i> *	Crom	pb	A	H_o	$T_a(^{\circ}\text{C})$
22	(F) GCCATCCATTCTTACCAG	12	175-185 (SO)	3	0.000	56
	(R) CACAGGTGTGGTGCTCA		190-225 (PG)	7	0.067	
			180-200 (XI)	5	0.242	
26	(F) CATGGTGCCGATTACGGT	10	95-100 (SO)	2	0.012	60
	(R) CATCTCCATCGCGGTCAT		95-110 (PG)	4	0.103	
			95-110 (XI)	4	0.050	
27	(F) TCGGACGTGGCATATGA	9	140-165 (SO)	4	0.010	54
	(R) CTGTTCCGAGCGAGAGT		140-210 (PG)	2	0.117	
			- (XI)	-	-	
29	(F) GACCAGTTCACCATGCAG	1	100-105 (SO)	2	0.000	60
	(R) GAGTGAGGCAGCAAGACA		90-130 (PG)	7	0.021	
			85-105 (XI)	4	0.051	
36	(F) AACGTTTCATCGGTTCTGG	4	170-195 (SO)	5	0.000	56
	(R) TGCTTGCCAGGTTATTCC		180-195 (PG)	4	0.098	
			160-170 (XI)	3	0.280	
39	(F) GCGTACTAGGCCATGATA	3	250-270 (SO)	2	0.000	56
	(R) TCCACGTAAGAACTCG		270-285 (PG)	4	0.150	
			250-265 (XI)	2	0.000	
42	(F) TGCAGGCTCTGAGCTAC	5	420-430 (SO)	2	0.000	56
	(R) AGAACAGATCTTGCCGTC		425-445 (PG)	4	0.010	
			420 (XI)	1	0.000	
63	(F) CAGGGGACAAGCACATA	2	115-145 (SO)	4	0.000	56
	(R) TAGACGATGTCGAGAAGG		100-145 (PG)	8	0.202	
			130-135 (XI)	2	0.041	

* Sequências dos pares de *primers* desenvolvidos por Brondani *et al.* (2001)

Figura 3 – Locos de microssatélites utilizados no estudo de sistema reprodutivo

3.2.2.3 Análise estatística dos dados

O sistema reprodutivo foi analisado com base no modelo de cruzamentos mistos de Ritland e Jain (1981) utilizando o programa MLTR (Ritland, 2002). Este modelo é fundamentado nas seguintes pressuposições: (1) cada evento reprodutivo é devido a um cruzamento aleatório (com probabilidade t) ou a uma autofecundação ($s = 1 - t$), (2) a probabilidade de cruzamento é independente do genótipo maternal, (3) o conjunto de pólen é homogêneo para todas as plantas maternais, (4) não há seleção entre a fertilização e a data de avaliação do genótipo das progênies, e (5) os alelos dos diferentes locos segregam independentemente (Ritland e Jain, 1981). Baseado nestas pressuposições os seguintes parâmetros foram estimados: taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$), taxa de cruzamento uniloco ($\hat{t}_s$), taxa de cruzamento bi-parental ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) e a correlação paternal (r_p) ou proporção de progênies de irmãos germanos entre as progênies resultantes de cruzamento. Os parâmetros foram estimados utilizando os procedimentos da máxima verossimilhança. O método Newton-Raphson foi utilizado para resolver a equação das estimativas da máxima verossimilhança, conforme recomendado por Ritland (1996). O número de doadores de pólen que contribuíram para cada família foi estimado utilizando a quantidade $1/r_p$ (Ritland 1989). O coeficiente de endogamia das plantas maternais ($\hat{F}_m$) foi calculado utilizando o programa MLTR (Ritland, 2002). Na ausência de cruzamentos biparentais, os valores de $\hat{t}_m$ e $\hat{t}_s$ devem ser os mesmos; contudo na presença de cruzamentos biparentais a estimativa $\hat{t}_s$ deve ser menor que $\hat{t}_m$ porque eventos de cruzamento que não são detectados ao nível uniloco possuem elevada probabilidade de serem detectados quando mais locos são examinados (Ritland, 1996). O erro padrão das estimativas foi calculado baseado em 100 bootstraps, onde as unidades de reamostragem foram plantas dentro de progênies para a taxa de cruzamento individual, e famílias para a taxa de cruzamento da população. O coeficiente médio de coancestria dentro de famílias (θ_{fam}) foi obtido da análise de variância de frequências gênicas, utilizando-se o software FSTAT (GOUDET, 2002).

3.2.3 Resultados

Todos os locos testados foram polimórficos nas populações, exceto o loco OG-42, monomórfico na população XI-1 (Tabela 2). Os locos tiveram variação de 0-5, 2-5 e 4-8 alelos respectivamente para as famílias provenientes de XI-1, SO-6 e PG-1, totalizando 21, 24 e 44 alelos. As heterozigosidades observadas (H_o) para cada loco foram baixas (Tabela 2) e variaram de 0,000 a 0,012, 0,000 a 0,280 e de 0,010 a 0,202, respectivamente para as famílias das populações XI-1, SO-6 e PG-1.

As estimativas das taxas de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$) foram baixas (0,011, 0,160 e 0,223, respectivamente para XI-1, SO-6 e PG-1) e significativamente diferentes de 1,0, conforme verificado pelo erro padrão (Tabela 3). Estes valores indicaram variação nas taxas de cruzamento das diferentes populações de *O. glumaepatula*, podendo estas se apresentar nas formas de autogamia absoluta e mista com predomínio de autogamia. As estimativas uniloco ($\hat{t}_s$) também foram baixas (0,003, 0,078 e 0,100, respectivamente para XI-1, SO-6 e PG-1) e significativamente diferentes de 1,0 reforçando a condição de espécie endogâmica. As estimativas das diferenças $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ também foram baixas, com valores 0,008, 0,083 e 0,123 nas três populações. Analisando-se a taxa de cruzamentos de cada família, em cada uma das populações estudadas (Tabela 4), verificou-se que as famílias SO-6 em geral não apresentaram cruzamentos ($\hat{t}_m$) (famílias 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 10) ou, quando apresentaram, os valores foram baixos (0,063, 0,052 e 0,001, respectivamente para as famílias 3, 7 e 9), sendo que destes valores observados 0,028, 0,045 e 0,001 corresponderam a cruzamentos biparentais nas mesmas famílias respectivamente. Nas famílias XI-1 todos os indivíduos praticaram algum cruzamento ($\hat{t}_m$) sendo que foram verificados valores de 0,049 até 0,782, enquanto os cruzamentos biparentais ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) variaram de 0,027 a 0,382. Nestas famílias observou-se que algumas podem apresentar níveis de cruzamento bastante elevados (0,782, 0,523 e 0,502 como é o caso das famílias 7, 2, 4, respectivamente). As famílias PG-1, contudo, apresentaram uma amplitude de variação ainda maior nos níveis de cruzamento ($\hat{t}_m$) compreendendo de -0,381 até 0,893. Do mesmo modo, os níveis de cruzamento biparentais ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) também compreenderam uma parte razoável, mas variável, do total dos cruzamentos, variando de -0,255 a 0,682. Isto mostrou que cruzamentos biparentais ocorrem nesta espécie, em todas as famílias que praticam algum nível de cruzamento.

Tabela 3 - Sistema reprodutivo em três populações de *Oryza glumaepatula*. Os parâmetros avaliados incluem a taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$), média de cruzamento uniloco ($\hat{t}_s$), cruzamento biparental ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), correlação de paternidade (r_p), número de doadores de pólen ($1/r_p$), índice de fixação maternal ($\hat{F}_m$) e o coeficiente de coancestria (θ_{fam})

Parâmetros	SO-6	XI-1	PG-1
Nº de famílias	10	10	10
Nº de indivíduos	100	100	100
$\hat{t}_m$	0,011 (0,010)	0,160 (0,057)	0,223 (0,040)
$\hat{t}_s$	0,003 (0,003)	0,078 (0,032)	0,100 (0,024)
$\hat{t}_m - \hat{t}_s$	0,008 (0,007)	0,083 (0,029)	0,123 (0,025)
r_p	0,999 (0,261)	0,564 (0,255)	0,765 (0,182)
$1/r_p$	1,00	1,77	1,31
$\hat{F}_m$	0,846 (0,06)	0,399 (0,120)	0,631 (0,100)
θ_{fam}	0,932 (0,028)	0,711 (0,077)	0,748 (0,052)

O índice de fixação maternal ($\hat{F}_m$) concorda com as outras estimativas indicando a presença de elevado grau de endogamia nas mães SO-6, intermediário para PG-1 e de menor intensidade para XI-1 (Tabela 3). A correlação de paternidade (r_p) dá suporte aos resultados, mostrando maior correlação para as famílias SO-6. Conforme os dados mostram pelos índices de fixação maternal e pela taxa de cruzamento uni e multilocos, essa população é composta de famílias de sistema reprodutivo autógamo absoluto devendo a mesma planta ser doadora dos gametas masculino e feminino (óvulo e grão de pólen), o que concorda com o número de doadores de pólen ($1/r_p$) para estas famílias como sendo igual a 1. Estes valores observados também concordam com o coeficiente de coancestria dentro de famílias (θ_{fam}) que foi de 0,932. A correlação de paternidade (r_p) de XI-1 foi a menor observada mostrando que a mesma possui um maior número de pais doadores de pólen concordando com os níveis de cruzamento uni e multilocos que são mais expressivos quando comparados com as famílias SO-6 (Tabela 3). O coeficiente de coancestria nas famílias (θ_{fam}) foi aproximadamente o mesmo que para as famílias PG-1; o que deve ter ocorrido devido ao fato de uma maior proporção dos cruzamentos ter ocorrido entre indivíduos aparentados. Na população PG-1, a correlação de paternidade (r_p) observada foi de 0,765, indicando a presença de um número ligeiramente menor de pais doadores de pólen ($1/r_p$), em relação a população XI, sendo apenas 1,31 (Tabela 3), verificando-se que o coeficiente de coancestria da família (θ_{fam}) foi praticamente o mesmo que nas famílias XI-1. Isto pode ser explicado pelo fato de existir um maior nível de cruzamentos entre indivíduos não aparentados ($\hat{t}_s$) quando comparados com as famílias XI-1, de 0,078 contra 0,100. Como a

população XI-1 apresentou menor taxa de cruzamentos ($\hat{t}_m$) que PG-1, deveria ter apresentado maior coeficiente de coancestria (θ_{fam}). No caso de PG-1, embora possua maior taxa cruzamentos ($\hat{t}_m$), a presença de cruzamentos biparentais também causou aumento do coeficiente de coancestria (θ_{fam}). Isto também pode ser confirmado nas taxas de cruzamento das diferentes famílias de cada população (Tabela 4).

A taxa média de cruzamentos ($\hat{t}$) avaliada por loco nas famílias de cada população (Tabela 5) indicou médias de 0,3%, 7,7% e 9,3%, respectivamente para XI-1, SO-6 e PG-1. Estes valores concordam com os observados para cruzamentos uniloco ($\hat{t}_s$) na Tabela 3. Por outro lado analisando-se os valores observados em cada loco nas famílias das três populações verificou-se que houve uma variação, nas taxas de cruzamentos, de 2,9% a 7,7%, indicando boa consistência e concorda com a condição mais autógama da espécie.

Tabela 4 - Taxa de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$), uniloco ($\hat{t}_s$) e biparental ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) por família/população

População	Família	$\hat{t}_m$	$\hat{t}_s$	$\hat{t}_m - \hat{t}_s$
SO-6	1	-0,045(0,04)	-0,009(0,01)	-0,036
	2	0,000(0,02)	0,000(0,01)	0,000
	3	0,063(0,18)	0,035(0,05)	0,028
	4	-0,098(0,05)	-0,005(0,02)	-0,093
	5	0,000(0,02)	0,000(0,02)	0,000
	6	0,000(0,02)	0,000(0,01)	0,000
	7	0,052(0,27)	0,007(0,15)	0,045
	8	0,000(0,05)	0,000(0,04)	0,000
	9	0,001(0,02)	0,000(0,02)	0,001
	10	0,000(0,02)	0,000(0,01)	0,000
XI-1	1	0,067(0,06)	0,030(0,03)	0,037
	2	0,523(0,20)	0,308(0,12)	0,215
	3	0,049(0,14)	0,022(0,06)	0,027
	4	0,502(0,16)	0,120(0,05)	0,382
	5	0,393(0,17)	0,195(0,09)	0,198
	6	0,405(0,16)	0,209(0,12)	0,196
	7	0,782(0,12)	0,428(0,25)	0,354
	8	0,375(0,21)	0,189(0,11)	0,186
	9	0,097(0,11)	0,047(0,06)	0,050
	10	0,431(0,22)	0,212(0,20)	0,219
PG-1	1	0,893(0,03)	0,211(0,12)	0,682
	2	0,107(0,17)	0,109(0,10)	-0,002
	3	0,100(0,10)	0,066(0,07)	0,034
	4	0,809(0,06)	0,218(0,08)	0,591
	5	0,201(0,29)	0,102(0,10)	0,099
	6	0,194(0,18)	0,062(0,06)	0,132
	7	0,392(0,18)	0,126(0,07)	0,266
	8	0,490(0,18)	0,191(0,07)	0,299
	9	-0,381(0,18)	-0,126(0,06)	-0,255
	10	0,339(0,42)	0,192(0,12)	0,147

Tabela 5 – Estimativa da taxa de cruzamento $\hat{t}$ por loco/população

Loco	SO-6	XI-1	PG-1	Média
OG-22	0,001 (0,000)	0,177 (0,075)	0,049 (0,052)	0,076
OG-26	0,001 (0,023)	0,085 (0,067)	0,110 (0,156)	0,065
OG-27	0,017 (0,016)	-	0,136 (0,062)	0,077
OG-29	0,001 (0,024)	0,150 (0,235)	0,025 (0,016)	0,059
OG-36	0,001 (0,000)	0,001 (0,036)	0,084 (0,039)	0,029
OG-39	0,001 (0,000)	0,001 (0,000)	0,186 (0,059)	0,063
OG-42	0,001 (0,000)	0,001 (0,000)	0,047 (0,038)	0,016
OG-63	0,001 (0,000)	0,122 (0,037)	0,103 (0,056)	0,075
média	0,003	0,077	0,093	0,058

3.2.4 Discussão

Oryza glumaepatula é uma espécie considerada autógama por alguns autores (Akimoto et al. 1998; Ge et al. 1999; Oliveira 2002), outros, porém, a consideram como sendo de sistema reprodutivo misto com predomínio de autogamia (Brondani et al., 2002, Karasawa et al. 2004, Karasawa et al. 2005a). Contudo, até o momento nenhum estudo ao nível de famílias tem comprovado esta condição. Sabe-se que existem variações na taxa de cruzamento entre as populações desta espécie, mas os dados são provenientes da estimativa da taxa de cruzamentos aparente (Karasawa et al. 2005b), o que levou a este estudo baseado em famílias de três populações SO, XI e PG que foram amostradas a partir de três regiões geográficas distintas (Rio Solimões – Estado da Amazônia, Rio Xingu – Estado do Mato Grosso e Rio Paraguai – Estado do Mato Grosso do Sul, respectivamente) (Tabela 1, Figuras 1 e 2).

Neste estudo as frequências alélicas de pólen e óvulo foram consideradas iguais dada condição de autogamia da espécie. Também se realizou teste considerando-as como sendo diferentes, não tendo resultado em diferença estatística entre essas frequências alélicas. Assim a condição básica do modelo misto de Ritland e Jain (1981) que assume que o conjunto de pólen e óvulo deve ser homogêneo quanto às frequências alélicas, não foi violada.

As taxa de cruzamentos multilocos ($\hat{t}_m$) observadas nas populações de *O. glumaepatula* foram baixas nas três populações variando de 1% a 22% de cruzamentos. As taxas $\hat{t}_m$ estimadas por famílias mostraram que nas famílias da população SO-6 raramente ocorrem cruzamentos. Nas famílias da população XI-1 todas as famílias apresentam cruzamentos, embora os níveis sejam de variação ampla (4,9% a 78,2%), desde autogamia até alogamia quase que absoluta. Também nas famílias da população PG-1 verificou-se ampla variação nas estimativas das taxas de cruzamentos

multilocos conforme pode ser visto na Tabela 4. Estas taxas, avaliadas ao nível de loco ($\hat{t}$), para as famílias de cada população, concordam com a taxa média uniloco ($\hat{t}_s$) para as três populações mostrando pequenos níveis de cruzamento. A média, das três populações, para cada loco também se mostrou coerente entre os locos, já que ocorreram variações pequenas, de 2,9% a 7,6%, sendo consideradas aceitáveis e de boa consistência em comparação aos demais índices. Os valores da taxa de cruzamento uni e multiloco da população SO-6, aproximam-se dos valores encontrados por Morishima e Barbier (1990) para a população de *O. rufipogon* de hábito de crescimento anual ($\hat{t}_s = 0,05 \sim 0,18$ e $\hat{t}_m = 0,043$) utilizando oito locos de isoenzimas. Porém, as populações de *O. rufipogon* de hábito de crescimento perene apresentaram taxas de cruzamento uniloco mais elevadas do que as descritas neste estudo ($\hat{t}_s = 0,35 \sim 0,92$ e $0,65 \sim 1,00$; $\hat{t}_m = 0,506$ e $0,559$, respectivamente para NE88 e CP20); contudo, no presente estudo as taxas multilocos de XI-1 e PG-1 foram intermediárias. Outros estudos também relataram taxas muito baixas para outras gramíneas. Marshall e Allard (1970) encontraram frequências de cruzamento, em *Avena barbata*, de 7,5% e 1,4%, respectivamente em ambientes méxico e xérico; Brown et al. (1978) relataram taxas de cruzamento de 2,1% a 4% para *Hordeum spontaneum*. Em estudos com a gramínea *Bromus mollis*, Hamrick e Allard (1972) relataram taxas de cruzamento de 2,1% e 5%, enquanto Brown et al. (1974) relataram 11% e 7%, respectivamente em ambientes méxico e xérico. Por outro lado, Sanders e Hamrick (1980) estudando 15 populações da gramínea perene *Elymus candensis* reportaram taxas de cruzamento variando de 0% a 25%. Os dados acima citados confirmam as informações de Stebbins (1974) de que espécies mais perenes têm preferência pela prática de cruzamentos entre indivíduos (alogamia), enquanto nas anuais a autofecundação deve ocorrer com mais frequência; por outro lado, a maioria dos gêneros de gramíneas são autógamas independentemente do hábito de crescimento.

Da pequena fração de cruzamentos multilocos ($\hat{t}_m$), verificou-se ainda que 50% ou mais ocorria entre indivíduos aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), ou seja, 0,008 de 0,011, 0,083 de 0,160 e 0,123 de 0,223, respectivamente para as famílias das populações SO-6, XI-1 e PG-1 (Tabela 3), fato este que deve ter contribuído para os elevados coeficientes de coancestria. Sabe-se que em populações panmíticas θ assume valores de 0,125 para meios irmãos, 0,25 para irmãos germanos e de 0,50 quando as progênies são oriundas de autofecundação. Pelos resultados da taxa de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$), da diferença entre uni e multilocos ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), pelos valores do coeficiente de coancestria (θ_{fam}) e pelos níveis de endogamia maternais, verifica-se que de fato se trata de

populações que praticam a autofertilização com mais frequência e que a maior parte da progênie é originada pela união do pólen e óvulo da mesma planta.

A estimativa indireta da correlação de paternidade ($r_p = 0,999, 0,564$ e $0,765$, respectivamente para SO-6, XI-1 e PG-1) foi elevada mostrando que um pequeno número de pais contribuíram como doadores de pólen ($1/r_p = 1,00, 1,77$ e $1,31$, respectivamente para SO-6, XI-1 e PG-1) mostrando que 1,10% , 9,02% e 17,06% das progênies eram irmãos germanos ($\hat{t}_m r_p$) e 0.001%, 6.98% e 5.24% eram meios irmãos [$\hat{t}_m (1 - r_p)$], respectivamente nas famílias das populações SO-6, XI-1 e PG-1. O restante dos indivíduos foi proveniente da autofertilização realizada pela planta materna.

Os ecótipos das três populações estudadas são diferenciados quanto à altitude dos locais (0, 400 e 100 metros, respectivamente para SO-6, XI-1 e PG-1), onde predominam três tipos de vegetação (floresta amazônica, cerrado e pantanal, respectivamente). Sabe-se que as populações do Rio Solimões são predominantemente anuais enquanto que as outras duas são mais perenes, podendo ser agrupadas nas margens dos rios, como a população XI-1, ou estar amplamente distribuídas por toda a bacia hidrográfica, no caso das populações PG do pantanal matogrossense. O tipo de vegetação costeira, o hábito de crescimento, a densidade, a forma de dispersão e o nível de prostração sobre a lâmina de água no rio podem ter grande influência nas atividades e acesso dos polinizadores, inclusive nas taxas de cruzamentos. Como as inflorescências caracterizam-se por apresentar flores hermafroditas e presença de heterostilia (com anteras longas e projetadas para o exterior), característica de espécies que praticam o cruzamento, esperavam-se níveis de cruzamentos mais expressivos; entretanto, ainda assim, não é surpreendente que as famílias de uma população dessa espécie possam apresentar sistema reprodutivo de autogamia absoluta enquanto que outras tenham ampla variação nas taxas de cruzamento entre famílias. Estudo recente demonstrou que as espécies polinizadas por insetos ou animais apresentam uma ampla variação na distribuição nas taxas de cruzamento entre indivíduos, podendo variar desde a autogamia absoluta até a alogamia absoluta enquanto as polinizadas pelo vento raramente apresentam valores intermediários (VOGLER; KALIZ, 2001) e que a visita não constante dos polinizadores favorece a autofertilização (KALIZ; VOGLER; HANLEY, 2004).

O sistema reprodutivo tem importância fundamental na amplificação e recombinação da variabilidade genética das populações de espécies. Logo, os desvios da panmixia observados em *O. glumaepatula* têm importantes implicações para a conservação e o melhoramento genético. Nas atividades de conservação *ex situ*, esses desvios fazem com que sejam necessárias amostras

maiores do que aquelas previstas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois estes desvios geram uma diminuição do tamanho efetivo amostral. Por outro lado, para a conservação *in situ* é necessária a identificação do maior número possível de populações com o intuito de se preservar ao máximo a diversidade existente, pois populações que tendem à autogamia geralmente apresentam grande diversidade interpopulacional devido à redução ou ausência de fluxo gênico. Os dados desta pesquisa mostraram que o sistema reprodutivo desta espécie é variável, dependendo da população, podendo se apresentar na forma de autogamia absoluta até formas mistas com predomínio de autogamia. Um problema decorrente das contínuas autofecundações é a perda da diversidade decorrente da fixação alélica a qual reduz flexibilidade da espécie em resposta as condições ambientais, fato que pode levar à extinção de populações em condições naturais (RICHARDS, 1986, 1997; HEDRICK, 2001; FRANKHAM, 2003).

3.3 Conclusões

O sistema reprodutivo da espécie *Oryza glumaepatula* foi considerado misto com predomínio de autogamia;

As taxas de cruzamento entre as populações desta espécie podem variar de 1% a 22,3%;

As taxas de cruzamento dentro das famílias de cada populações podem variar de 0% a 1%; 4,9% a 78,2% e de 0 a 89,3%, respectivamente para SO-6, XI-1 e PG-1;

Nesta espécie, em procedimentos de coleta de sementes, é preciso levar em conta que haverá mais variação genética entre do que dentro de progênes.

Referências

- AKIMOTO, M.; SHIMAMOTO, Y.; MORISHIMA, H. Population genetic structure of wild *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by its life-history traits. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p.1371-1381, 1998.
- BARRET, S.C.H.; SHORE, J.S. Isozyme variation in colonizing plants. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S (Ed.). **Isozyme in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1989. p.106-126.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silverstaining of DNA in polyacrilamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 196, p. 80-83, 1991.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, Lund, v.134, p.59-71, 2001.
- BRONDANI R.P.V., RANGEL P.H.N., ZUCCHI M.I., MAGALHÃES, M.R., BORBA, T.C.O. AND BRONDANI, C. Análise da variabilidade genética de populações brasileiras de *Oryza glumaepatula* utilizando microssatélites. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, 1., 2002, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis:EMBRAPA, 2002. p. 232-235.
- BROWN, A.H.D. Genetic characterization of plant mating system. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Massachusetts. 1990. p.145-162.
- BROWN, A.H.D.; SOHARY, D.; NEVO, E. Outcrossing rates and heterozygosity in natural populations of *Hordeum spontaneum* Koch in Israel. **Heredity**, London, v.41, n.1, p.49-62, 1978.
- BROWN, A.H.D.; MARSHALL, D.R.; ALBRECHT, L. The maintenance of alcohol dehydrogenase polymorphism in *Bromus mollis*. L. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.27, p.545-559, 1974.
- BUSO, G.S.C.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p.107-117, 1998.
- CROW, J.F.; KIMURA, M. Evolution in sexual and asexual populations. **American Naturalist**, Chicago, v.99, p.439-450, 1965.
- ENNOS, R.A.; CLEGG, M.T. Effect of populations substructuring on estimates of outcrossing rate in plant population. **Heredity**, London, v.48, p.283-292, 1982.
- EDWARDS, A.; HANNIBD, H.A.; JIN, L.; CASKEY, C.T.; CHAKRABORKY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, San Diego, v.12, p.241-253, 1992.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 3rd ed. Embrapa/Cenargen, Brasília, 1998. 220p.

FRANCESCHINELLI, E.V.; BAWA, K.S. The effect of ecological factors on the mating system of a South American Shrub species (*Helicteres brevispira*). **Heredity**, London, v.84, p.116-123, 2000.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendue Biologies**, Paris, v.326, p.22-29, 2003.

GE, S.; OLIVEIRA, G.X.; SCHAAL, B.A.; GAO, L.Z.; HONG, D.Y. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. **Heredity**, London, v.82, p.1-7, 1999.

GOUDET, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. **Heredity**, London, v.86, p.485-486 <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K.S. Effect on forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, Cambridge, v.10, p.757-768, 1996.

HAMRICK, J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; Soltis, P.S. **Isozyme in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1989. p.87-105.

HAMRICK, J.L.; ALLARD, R.W. Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, Washington, v.69, p.2100-2104, 1972.

HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationship between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review Ecology Systematics**, Palo Alto, v.10, p.173-200, 1979.

HAMRICK, J.L.; GOODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sinauer: Sunderland, 1989. p. 43-63.

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites: evolution and applications**, 2000. p.1-9.

HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v.16, n.11, p.629-636, 2001.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE-LEON, D. **Laboratory Protocols: CYMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Mexico: CYMMYT, 1994.

HOLSINGER, K.E. Reproductive systems and evolution in vascular plants. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, New York, v.97, n.13, p.7037-7042, 2000.

JEFFREYS, A.J.; ROYLE, N.J.; WILSON, V.; WONG, Z. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. **Nature**, London, v.332, p.278-281, 1988.

KALISZ, S.; VOGLER, D.W.; HANLEY, K.M. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. **Nature**, London, v.430, p.884-887, 2004.

KARASAWA, M.M.G.; BRESSAN, E.A.; VEASEY, E.A.; VENCovsky, R. Extração, quantificação e otimização de primers em *Oryza glumaepatula*. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 20., 2003, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba:FEALQ, 2003, p.92.

KARASAWA, M.M.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VEASEY, E.A. Avaliação da estrutura genética de *Oryza glumaepatula* Steud pelo uso de marcadores moleculares de microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis:SBG, 2004. 1 CDROOM.

KARASAWA, M.M.G.; SILVA, C.M.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VEASEY, E.A. Diversidade genética de populações brasileiras de *Oryza glumaepatula* avaliada com marcadores de microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005a, Gramado. **Anais...** Gramado:SBMP, 2005a. 1 CDROOM.

KARASAWA, M.M.G.; SILVA, C.M.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VEASEY, E.A. Sistema reprodutivo de *Oryza glumaepatula* avaliado por meio de marcadores de microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005b, Gramado. **Anais...** Gramado:SBMP, 2005b. 1 CDROOM.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.15, p.65-95, 1984.

MARSHALL, D.R.; ALLARD, R.W. Maintenance of isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena barbata*. **Genetics**, Austin, v.66, p.393-399, 1970.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellite are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, London, v.30, p.194-200, 2002.

MORISHIMA, H.; BARBIER, P. Mating system and genetic structure of natural populations in wild rice *Oryza rufipogon*. **Plant Species Biology**, v.5, p.31-39, 1990.

MURAWASKY, D.A.; HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the plant mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, London, v.67, p.167-174, 1991.

OLIVEIRA, G.C.X. **Padrões de variação fenotípica e ecologia de *Oryzae* selvagens da Amazônia**. 1993. 303p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1993.

OLIVEIRA, G.C.X. Geographic distribution of wild *Oryza* species in Brazil. In: MORISHIMA, H.; MARTINS, P.S. (Org.). **Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with emphasis on the genus *Oryza***. Report of 1992/93 Amazon Project. Mishima, Japan, 1994, p. 10-15.

OLIVEIRA, G.C.X. **A molecular phylogenetic analysis of *Oryza* L. based on chloroplast DNA sequences**. 2002, 283p. Philosophy PhD Thesis, University of Saint Louis, Saint Louis, 2002.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, Oxford, v.4, p.347-354, 1995.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1997. 529p.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. London: Chapman & Hall, 1986, 529p.

RITLAND, K.; JAIN, S.K. A model for estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n -independent loci. **Heredity**, London, v.47, p.35-52, 1981.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v.43, p.848-859, 1989.

RITLAND, K. **MLTR**: multilocus mating system program. Version 1.1. 1996.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, London, v.88, p.221-228, 2002.

SANDERS, T.B.; HAMRICK, J.L. Variation in the breeding system of *Elymus Canadensis*. **Evolution**, Lancaster, v.34, n.1, p.117-122, 1980.

STEBBINS, G.L. **Flowering plants**. Cambridge: Massachusetts, 1974. 398p.

VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREINER, N.B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revised. **Genetics**, Austin, v.133, p.737-749, 1993.

VAUGHAN, D.A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.139-146, 2003. www.Current-opinion.com. Acesso em 18 de janeiro de 2004.

VOGLER, D.W.; KALISZ, S. Sex among flowers: the distribution of plant mating systems. **Evolution**, Lancaster, v.55, n.1, p.202-204, 2001.

WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular General Genetics**, Berlin, v.241, p.225-235, 1993.