

**Estrutura Genética de
Populações Silvestres de
Oryza glumaepatula em
Três Biomas Brasileiros
Utilizando Marcadores
Microsatélites**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimarzio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Sérgio Fausto

Dietrich Gerhard Quast

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa

Herbert Cavalcante de Lima

Gustavo Kauark Chianca

Diretores-Executivos

Embrapa Arroz e Feijão

Pedro Antonio Arraes Pereira

Chefe-Geral



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1678-9601

Dezembro, 2003

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 5

Estrutura Genética de Populações Silvestres de *Oryza glumaepatula* em Três Biomass Brasileiros Utilizando Marcadores Microssatélites

Rosana Pereira Vianello Brondani
Paulo Hideo Nakano Rangel
Maria Imaculada Zucchi
Mara Rúbia Magalhães
Tereza Cristina O. Borba
Roland Vencovsky
Claudio Brondani

Santo Antônio de Goiás, GO
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia Goiânia a Nova Veneza Km 12 Zona Rural
Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO
Fone: (62) 533 2110
Fax: (62) 533 2100
www.cnpaf.embrapa.br
sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Carlos Agustin Rava*
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Supervisor editorial: *Marina A. Souza de Oliveira*
Revisão gramatical: *Vera Maria T. Silva*
Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*
Capa: *Ronaldo Cordeiro de Toledo Gomes*
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2003): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Arroz e Feijão

Estrutura genética de populações silvestres de *Oryza glumaepatula* em três biomas brasileiros utilizando marcadores microssatélites / Rosana Pereira Vianello Brondani ... [et al.]. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2003.

27 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 5)

1. Arroz Silvestre – Variabilidade Genética. 2. Marcador Molecular. I. Brondani, Rosana Pereira Vianello. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 633.178 (21. ed.)

© Embrapa 2003

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	11
Populações avaliadas	11
Extração de DNA genômico e análise com marcadores microssatélites ..	11
Triagem de locos microssatélites polimórficos	13
Análise estatística dos dados	13
Resultados	14
Triagem e caracterização dos locos microssatélites	14
Análise estatística dos dados	16
Discussão	20
Referências Bibliográficas	25

Estrutura Genética de Populações Silvestres de *Oryza glumaepatula* em Três Biomas Brasileiros Utilizando Marcadores Microsatélites

*Rosana Pereira Vianello Brondani*²; *Paulo Hideo Nakano Rangel*³; *Maria Imaculada Zucchi*⁴; *Mara Rúbia Magalhães*⁵; *Tereza Cristina O. Borba*⁵; *Roland Vencovsky*⁴; *Claudio Brondani*⁶

Resumo

Oryza glumaepatula, uma das 21 espécies silvestres do gênero *Oryza*, no qual está incluído o arroz cultivado (*O. sativa*), constitui uma valiosa fonte doadora de alelos favoráveis para características de interesse agrônomo desta espécie. Diversas áreas de ocorrência natural de *O. glumaepatula* estão sob ameaça de devastação e, desta forma, a implementação de estratégias de conservação destes recursos genéticos a partir de estudos de genética de populações é de extrema relevância. Marcadores moleculares microsatélites, ou SSR, são uma ferramenta útil para investigar questões relacionadas ao sistema de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética das populações naturais de *O. glumaepatula*. Este trabalho objetivou caracterizar a variabilidade genética e estimar os parâmetros populacionais de 30 populações de *O. glumaepatula* provenientes de três biomas brasileiros, através do uso de dez marcadores microsatélites. Os

¹ Pesquisa em desenvolvimento com suporte financeiro do CNPq

² Engenheira Agrônoma, Doutora em Biologia Molecular Vegetal, Embrapa Arroz e Feijão. Rod. Goiânia a Nova Veneza, Km 12, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO. rosanavb@cnpaf.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de plantas, Embrapa Arroz e Feijão phrangel@cnpaf.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética. Departamento de Genética / ESALQ-USP. Caixa Postal 96, 13400-000 Piracicaba, SP. mizucchi@carpa.ciagri.usp.br

⁵ Bolsista do CNPq, Embrapa Arroz e Feijão: oliveiraborba@yahoo.com.br, maramagalhaes@yahoo.com.br

⁶ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Biologia Molecular, Embrapa Arroz e Feijão. brondani@cnpaf.embrapa.br

níveis de variabilidade alélica para os locos SSR apresentaram uma média de 10,3 alelos por loco gênico e um valor médio de frequências alélicas de 9,7%. Os valores de heterozigosidade esperada variaram entre 63% e 86%. Para as 30 populações avaliadas, as heterozigosidades médias observada e esperada foram de 2,7% e 11,3%, respectivamente, indicando um excesso de homozigotos decorrente do hábito reprodutivo preferencialmente autógamo apresentado por estas espécies. O índice de fixação estimado (\hat{F}_{IS}) foi de 79%, o qual diferiu significativamente de zero, indicando uma elevada endogamia localizada dentro de cada população de *O. glumaepatula*. O índice de endogamia total da espécie (\hat{F}_{IT}) foi de 98%, e os índices de diversidade genética entre populações, \hat{F}_{ST} e \hat{R}_{ST} , foram de 85% e 90%, respectivamente, indicando uma compensação da homogeneidade genética dentro de populações através dos maiores índices de variação genética encontrados entre populações. Assim, principalmente para populações localizadas em regiões sob ameaça de devastação, é urgente que se criem condições de preservação *in situ*, ou que se façam coletas visando a preservação *ex situ*, a fim de evitar a perda da variabilidade genética da espécie.

Termos para indexação: arroz silvestre, SSR, conservação, marcadores moleculares.

Genetic Structure of Wild *Oryza glumaepatula* Populations in Three Brazilian Biomes Using Microsatellite Markers

Abstract

O. glumaepatula, one of the 21 wild species of *Oryza* genus, constitute a promising donor of favorable alleles for agronomic traits of cultivated rice (*O. sativa*). Areas of *O. glumaepatula* occurrence are threatened by devastation and thus the implementation of conservation strategies is extremely relevant. This study aimed to characterize the genetic variability and estimate populational parameters of 30 *O. glumaepatula* populations from three Brazilian biomes using 10 microsatellite markers. The levels of allelic variability for the SSR loci presented a mean of 10.3 alleles per gene locus and 0.097 average allelic frequency value. The expected total heterozygosity values ranged from 0.63 to 0.86. For the 30 populations, the mean observed and expected heterozygosities were 0.027 and 0.113 within population, respectively, indicating an excess of homozygotes resulting from the preferentially self pollinating reproduction habit. The estimated fixation index (\hat{F}_{IS}) was 0.79 that differed significantly from zero, indicating high inbreeding within each *O. glumaepatula* population. The total inbreeding of the species (\hat{F}_{IT}) was 0.98 and the among population genetic diversity indexes, \hat{F}_{ST} and \hat{R}_{ST} , were 0.85 and 0.90, respectively, indicating high genetic variability among populations. Thus, especially for populations located in regions threatened with devastation, it is urgent that in situ preservation conditions should be created or that collections be made for ex situ preservation to prevent loss of the species genetic variability.

Index terms: wild rice, SSR, conservation, molecular markers.

Introdução

Muitas espécies silvestres têm sido utilizadas como fonte adicional de variabilidade genética em programas de melhoramento de espécies cultivadas. Para o caso do arroz, existem 21 espécies silvestres, sendo que seis constituem o *pool* gênico primário, as quais são diplóides e possuem o genoma AA, sendo a obtenção de híbridos férteis com o arroz bastante facilitada (Khush, 1997). No Brasil, ocorrem três espécies silvestres do gênero *Oryza*, e somente *O. glumaepatula* pertence ao *pool* gênico primário. Esta espécie está completamente adaptada às condições de solo, clima e temperatura tropicais (Brondani et al., 2001) e, como o arroz cultivado é de origem asiática, existe a possibilidade de serem transferidos genes de *O. glumaepatula* para *O. sativa* para melhorar a resistência a estresses bióticos e abióticos. O conhecimento da variabilidade genética de populações nativas de *O. glumaepatula* é de fundamental importância para assegurar a preservação da espécie, além de identificar acessos geneticamente divergentes para serem utilizados em cruzamentos interespecíficos com o arroz cultivado. Exemplos de sucesso incluem o gene para resistência ao tungro vírus de *O. nivara* para o arroz cultivado, o gene para resistência à bacteriose do arroz a partir de *O. longistaminata*, novas fontes de macho-esterilidade citoplasmática de *O. rufipogon* para o arroz (Brar & Khush, 1997) e genes relacionados ao aumento do potencial produtivo provenientes de *O. glumaepatula* introduzidos na espécie cultivada *O. sativa* (Brondani et al., 2002).

Os avanços obtidos com a genética molecular têm possibilitado a ampliação dos conhecimentos sobre as populações das espécies silvestres, através da determinação da variabilidade genética a partir do polimorfismo encontrado a nível de DNA, utilizando marcadores moleculares. Dentre as classes de marcadores moleculares existentes, os microssatélites (SSR, *Simple Sequence Repeats*) destacam-se das demais por serem frequentes e distribuídos ao acaso no genoma de eucariotos, por apresentarem expressão codominante e um elevado conteúdo informativo em função do multialelismo, o qual é resultante de variações no número de seqüências repetidas, além da sua facilidade de obtenção dos dados pela reação automatizada via técnica de PCR. Devido a estas características, os marcadores microssatélites têm sido utilizados na caracterização de populações naturais de plantas (Collevatti et al. 1999; Lemes et al., 2002) através de estudos de genética de populações, fluxo gênico e análise de paternidade (Wright & Bentzen, 1994).

Este trabalho objetivou caracterizar populações de *O. glumaepatula* oriundas de três Biomas do Brasil (Região Amazônica, Pantanal e Cerrados), através das estimativas dos parâmetros populacionais, utilizando marcadores microssatélites, visando gerar informações úteis para conservação e utilização desta espécie silvestre no melhoramento genético.

Material e Métodos

Populações avaliadas

Foram utilizadas 30 populações de *O. glumaepatula*, sendo 23 oriundas de coletas nas veredas dos Cerrados do Estado de Goiás, duas da Região Amazônica (Rio Solimões), e cinco do Pantanal Matogrossense. O número de indivíduos por população foi variável, totalizando 414 genótipos (Tabela 1).

Extração de DNA genômico e análise com marcadores microssatélites

Amostras de sementes de cada população foram germinadas em rolos de papel e, após uma semana, transplantadas para vasos em casa de vegetação. Vinte dias após o transplante, foram coletadas amostras do tecido foliar de cada indivíduo para a extração de DNA genômico. As extrações de DNA foram realizadas segundo protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987). A concentração do DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8% por comparação com o DNA-padrão do fago lambda, sendo ajustada para 3 ng/μl.

A análise genética foi feita utilizando marcadores microssatélites previamente publicados (Akagi et al., 1996; Chen et al., 1997; Temnykh et al., 2000; Brondani et al., 2001). As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 13 μl contendo: 0,3 μM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 1 unidade da enzima Taq DNA polymerase, 0,2 mM de cada dNTP, 10mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, DMSO (50%) e 7,5 ng de DNA total. As reações de amplificação de PCR foram conduzidas em termociclador PT-100 *Thermal Controller* (MJ Research) com a seguinte

Tabela 1. Número de indivíduos amostrados e localização geográfica das áreas de coleta das populações de *O. glumaepatula* utilizadas no estudo.

População	Nº Indivíduos	Município/Estado	Local	Latitude	Longitude	Observações sobre o local de coleta
1	6	Itapirapuã/GO	Fazenda Córrego Fundo	S 15° 28' 180"	W 50° 50' 899"	Vereda represada/Bioma Cerrado
2	17	Itapirapuã/GO	Fazenda Córrego Fundo	S 15° 28' 180"	W 50° 50' 899"	Vereda represada/Bioma Cerrado
3	18	Itapirapuã/GO	Fazenda Córrego Fundo	S 15° 28' 180"	W 50° 50' 899"	Vereda represada/Bioma Cerrado
4	14	Itapirapuã/GO	Fazenda Santa Ângela	S 15/ 32' 306"	W 49° 44' 150"	Vereda represada/Bioma Cerrado
5	8	Itapirapuã/GO	Fazenda Santa Ângela	S 15/ 32' 306"	W 49° 44' 150"	Vereda represada/Bioma Cerrado
6	17	Itapirapuã/GO	Fazenda Rio Vermelho	S 15° 28' 179"	W 50° 50' 900"	Vereda intacta/Bioma Cerrado
7	16	Itapirapuã/GO	Fazenda Rio Vermelho	S 15° 28' 179"	W 50° 50' 900"	Vereda intacta/Bioma Cerrado
8	10	Itapirapuã/GO	Fazenda Santa Ângela	S 15/ 32' 306"	W 49° 44' 150"	Vereda represada/Bioma Cerrado
9	16	Itapirapuã/GO	Fazenda Santa Ângela	S 15/ 32' 306"	W 49° 44' 150"	Vereda represada/Bioma Cerrado
10	24	Itapirapuã/GO	Fazenda Santa Ângela	S 15/ 32' 306"	W 49° 44' 150"	Vereda represada/Bioma Cerrado
11	12	Itapirapuã/GO	Fazenda Santa Ângela	S 15/ 32' 306"	W 49° 44' 150"	Vereda represada/Bioma Cerrado
12	22	MS	Rio Taquari (RTA 1)	S 19° 15' 00"	W 57° 13' 00"	Rio Taquari/ Bioma Pantanal
13	19	Itapirapuã/GO	Fazenda Rio Vermelho	S 15° 28' 179"	W 50° 50' 900"	Vereda intacta/ Bioma Cerrado
14	12	Itapirapuã/GO	Fazenda Rio Vermelho	S 15° 28' 179"	W 50° 50' 900"	Vereda intacta/ Bioma Cerrado
15	17	Itapirapuã/GO	Fazenda Rio Vermelho	S 15° 28' 179"	W 50° 50' 900"	Vereda intacta/ Bioma Cerrado
16	12	Itapirapuã/GO	Fazenda Rio Vermelho	S 13° 14' 995"	W 50° 35' 759"	Vereda intacta/ Bioma Cerrado
17	11	Itapirapuã/GO	Fazenda Rio Vermelho	S 13° 14' 995"	W 50° 35' 759"	Vereda intacta/ Bioma Cerrado
18	10	Aruanã/GO	Fazenda São Carlos	S 11° 46' 429"	W 49° 49' 088"	Vereda intacta/ Bioma Cerrado
19	9	Aruanã/GO	Fazenda São Carlos	S 11° 46' 429"	W 49° 49' 088"	Vereda intacta/ Bioma Cerrado
20	19	Uruana/GO	Laticínios Dois Irmãos	S 15° 38' 955"	W 49° 43' 028"	Vereda represada/ Bioma Cerrado
21	17	Uruana/GO	Fazenda Santo Antônio	S 16° 30' 249"	W 49° 16' 944"	Vereda represada/ Bioma Cerrado
22	13	Uruana/GO	Fazenda Santo Antônio	S 15° 39' 087"	W 49° 42' 660"	Vereda represada/ Bioma Cerrado
23	15	Uruana/GO	Fazenda Santo Antônio	S 15° 38' 956"	W 49° 43' 028"	Vereda represada/ Bioma Cerrado
24	13	AM	Rio Solimões (RS 16)	S 3° 18' 00"	W 60° 36' 00"	Rio Solimões/ Bioma Amazonas
25	3	AM	Rio Solimões (RS 50)	S 3° 15' 00"	W 60° 11' 00"	Rio Solimões/ Bioma Amazonas
26	8	MS	Rio Paraguai (RPA 9)			Rio Paraguai/ Bioma Pantanal
27	5	MS	Rio Taquari RTA 2)	S 19° 15' 00"	W 57° 13' 00"	Rio Taquari/ Bioma Pantanal
28	21	MS	Rio Negro (RNE 2)	S 19° 15' 00"	W 57° 09' 00"	Rio Negro/ Bioma Pantanal
29	7	MS	Rio Taquari	S 19° 15' 00"	W 57° 13' 00"	Rio Taquari/ Bioma Pantanal
30	12	Itapirapuã/GO	Fazenda Santa Ângela	S 15/ 32' 306"	W 49° 44' 150"	Vereda represada/ Bioma Cerrado

programação: um pré-ciclo de 96 °C por 2 min; seguido por 29 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; e um passo final de 72 °C por 7 min. A checagem da amplificação foi feita por eletroforese horizontal em agarose 3% contendo tampão TBE 1X (0,09M Tris Borato e 2mM EDTA) e 0,2 µg/ml de brometo de etídio.

Triagem de locos microssatélites polimórficos

Ao todo, 133 locos microssatélites, sendo 28 escolhidos na literatura com base nos seus valores de heterozigidade esperada maiores que 70%, e 105 derivados de seqüências do programa de seqüenciamento do genoma do arroz fizeram parte da seleção inicial e foram testados em seis genótipos de *O. glumaepatula* de diferentes populações. Após esta análise, apenas os locos SSR que apresentaram maior capacidade de detectar variabilidade alélica foram utilizados para a genotipagem dos 414 indivíduos. A detecção de polimorfismo alélico foi efetuada em géis desnaturantes de poliacrilamida a 4%, contendo 7M de uréia e tampão TBE 1X. A visualização dos produtos amplificados deu-se a partir da coloração do gel com nitrato de prata, de acordo com Bassam et al. (1991). As estimativas dos tamanhos dos fragmentos amplificados foi determinada comparando-se sua posição no gel em relação à posição das bandas de tamanho definido do marcador padrão de peso molecular (Ladder 10 bp).

Análise estatística dos dados

Os dados genotípicos obtidos a partir da análise de dez locos microssatélites nos 414 indivíduos foram anotados em uma planilha Excel contendo o genótipo de cada indivíduo separadamente. Os locos que não amplificaram de forma consistente ou que deixaram dúvidas de interpretação foram eliminados da análise. As frequências alélicas foram submetidas ao teste exato de Fisher para as proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme definido por Weir (1996), utilizando o programa TFGA (Miller, 1997). O teste exato de Fisher foi feito utilizando o método convencional de Monte Carlo utilizando dez *batches* com 1000 permutações por *batch*. A diversidade genética e as estatísticas F foram estimadas sob modelo aleatório de acordo com Weir (1996). As frequências alélicas, o número de alelos por loco (A), a heterozigidade observada (H_o) e esperada (H_e) e as

estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{ST} e F_{ST}), foram estimadas utilizando o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2000). A taxa de fecundação cruzada aparente (\hat{t}_d) foi calculada a partir do coeficiente de endogamia \hat{f} obtido através das heterozigosidades médias esperada e observada. O número médio de migrantes (Nm) por geração (fluxo gênico) foi calculado pela fórmula: $Nm = 1/4 (1/F_{ST} - 1)$, onde F_{ST} é a medida da diversidade genética entre populações (Wright, 1931). A estatística R_{ST} (Slatkin, 1995) e o fluxo gênico (Nm) foram estimados utilizando o programa R_{ST} Calc (Goodman, 1997). Os dendrogramas foram construídos a partir da matriz de distância genética de Nei obtida pelo programa TFGA (Miller, 1997) e pelo critério de agrupamento UPGMA, utilizando o programa NTSYS (Rohlf, 1989). A estabilidade dos agrupamentos foi testada através de procedimento de reamostragem com 10000 *bootstrap* utilizando o *Software* Dboot (Coelho, 2001).

Resultados

Triagem e caracterização dos locos microssatélites

Dos 133 locos SSR avaliados, foram selecionados, pela maior capacidade de detectar variabilidade alélica e qualidade dos produtos amplificados, dez locos SSRs, sendo sete baseados em seqüências repetidas de dinucleotídeos (OG7, OG17, OG44, OG89, RM224, RM248 e RM259), e três baseados em trinucleotídeos (4879, 4961 e 5370). O número total de alelos encontrados foi de 103, sendo que os níveis de variabilidade alélica para os dez locos SSRs genotipados nas 30 populações variaram entre o máximo de 17 alelos para o loco RM259 e o mínimo de sete para os locos RM224 e 4961, com uma média de 10,3 alelos por loco gênico (Figura 1). A distribuição das freqüências alélicas (Figura 2) variou entre 57% para os alelos 133 e 137 do loco 4961 e 0,1% para o alelo 133 dos locos OG07 e OG89 e alelo 117 do loco 4879, apresentando um valor médio de 9,7%. O número de alelos e suas freqüências relativas resultaram em valores de heterozigosidade esperada que variaram de 63% para o loco 4961 a 86% para o loco RM259.

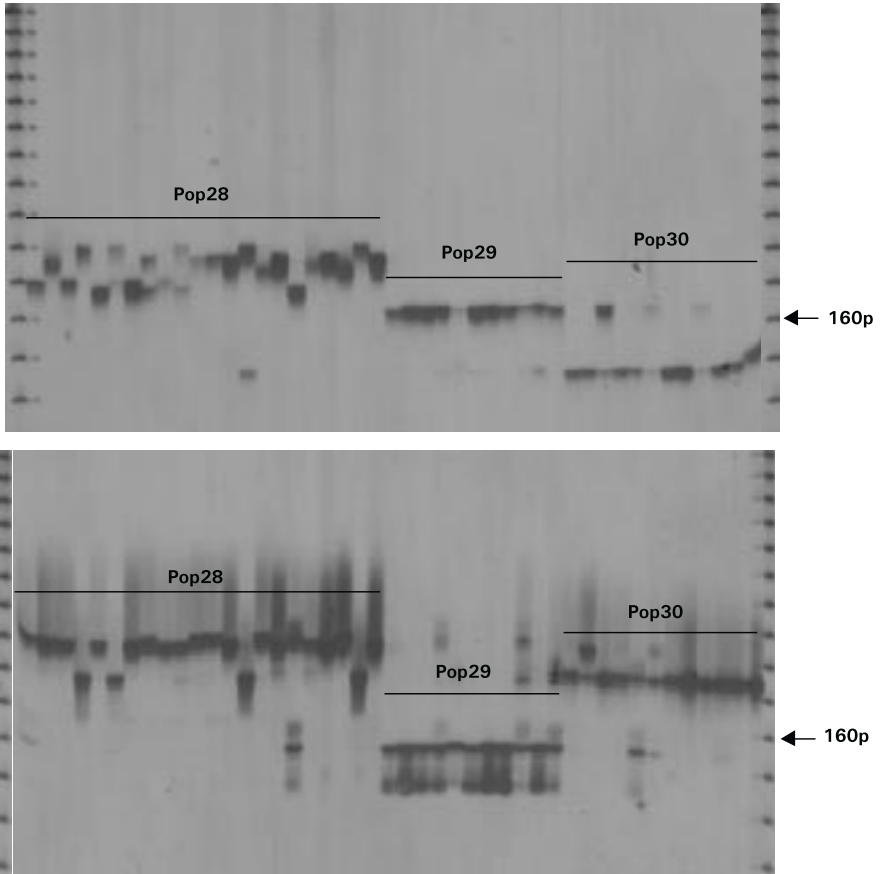


Fig. 1. Caracterização genética em três populações silvestres de *Oryza glumaepatula* com base em marcadores microsatélites, utilizando gel desnaturante de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata. Os locos RM259 e OG44 estão representados nos painéis A e B, respectivamente. O *ladder* 10 pb foi utilizado como marcador de peso molecular.

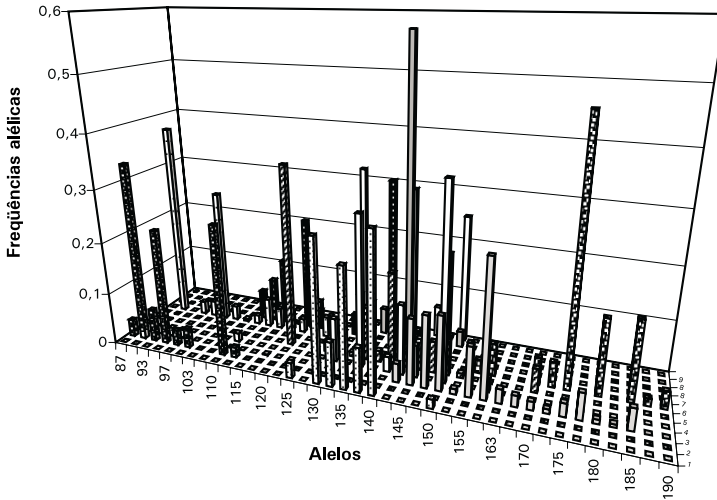


Fig. 2. Histograma das frequências alélicas dos dez marcadores microssatélites, estimadas para 414 indivíduos de *Oryza glumaepatula*. Eixo Y: frequência alélica; eixo X: número do alelo; eixo Z: marcador microssatélite.

Análise estatística dos dados

Para as 30 populações de *O. glumaepatula* analisadas com os dez locos SSR, o número de alelos variou de um a 3,2 (Tabela 2), tendo sido maior para as populações 28 (3,2 alelos) e 23 (3 alelos), coletadas nos Biomas Pantanal e Cerrado, respectivamente. Os valores médios dos índices de diversidade gênica (\hat{H}_e) (Tabela 3) foram maiores para as populações do Bioma Pantanal (25,7%) e menores para as do Bioma Amazônia (5,6%), sendo que as populações 22 (45%) e 23 (56%), ambas ocorrentes em áreas de várzeas do Bioma Cerrado, foram as que apresentaram os maiores valores de \hat{H}_e (Tabela 2). O valor médio encontrado para o índice de \hat{H}_e (11,5%) foi superior ao índice de \hat{H}_o (2,7%), sendo que apenas para duas populações (29 e 30) os valores de \hat{H}_o foram maiores (Tabela 2). Ao todo foram identificados 29 alelos privados, distribuídos em 12 das 30 populações avaliadas, sendo o maior número observado nas populações 12, 28 e 29 ocorrentes no Bioma Pantanal (Figura 3). Considerando o Bioma Cerrado, as populações coletadas em áreas de vereda represada, ou seja, áreas que sofreram fragmentação, apresentaram 29 alelos privados e maior \hat{H}_e (51,8%), enquanto as coletadas em áreas de vereda intacta apresentaram 14 alelos privados e $\hat{H}_e = 48,9\%$.

Tabela 2. Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em 30 populações de *Oryza glumaepatula*.

Pop	N	L	A	H_o	H_e	f	t_a
1	6	10	1,000	0,000	0,000	-	-
2	17	10	1,000	0,000	0,000	-	-
3	18	10	1,200	0,000	0,069	1,000	0,000
4	14	10	1,100	0,000	0,013	1,000	0,000
5	8	10	1,000	0,000	0,023	1,000	0,000
6	17	10	1,100	0,000	0,041	1,000	0,000
7	16	10	1,000	0,000	0,000	-	-
8	17	10	1,200	0,000	0,023	1,000	0,000
9	16	10	1,400	0,000	0,120	1,000	0,000
10	24	10	1,000	0,000	0,000	-	-
11	12	10	1,100	0,008	0,026	0,684	0,188
12	22	10	1,900	0,027	0,197	0,864	0,073
13	19	10	1,100	0,005	0,030	0,833	0,091
14	12	10	1,200	0,000	0,030	1,000	0,000
15	17	10	1,100	0,000	0,011	1,000	0,000
16	12	10	1,100	0,008	0,034	0,765	0,133
17	11	10	1,200	0,000	0,062	1,000	0,000
18	10	10	1,100	0,010	0,010	0,000	1,000
19	9	10	1,000	0,000	0,000	-	-
20	19	10	2,000	0,087	0,269	0,680	0,190
21	17	10	2,000	0,005	0,253	0,977	0,011
22	13	10	2,800	0,121	0,449	0,740	0,149
23	15	10	3,000	0,133	0,559	0,770	0,130
24	13	10	1,300	0,007	0,059	0,873	0,068
25	3	10	1,100	0,000	0,053	1,000	0,000
26	8	10	2,500	0,104	0,356	0,722	0,161
27	5	10	1,900	0,160	0,324	0,546	0,294
28	21	10	3,200	0,074	0,371	0,802	0,109
29	11	10	1,300	0,036	0,034	-0,052	1,110
30	12	10	1,300	0,033	0,031	-0,047	1,099
Média		10	1,434	0,027	0,113	0,761	0,135

N: número de indivíduos amostrados, L: número de locos microssatélites, A: número médio de alelos; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; f : índice de fixação e t_a : taxa de cruzamento aparente.

Tabela 3. Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em 30 populações de *Oryza glumaepatula*, separadas por Bioma.

Bioma	N	n	L _p	H _o	H _e	f	t _a
Amazônia	16	2	14	0,004	0,056	0,929	0,0363
Pantanal	67	5	45	0,080	0,257	0,688	0,184
Cerrado	331	23	19	0,018	0,089	0,797	0,113
Média	414	30	26	0,027	0,115	0,761	0,135

N: número de indivíduos amostrados, n: número de populações, L_p: número de alelos privados nas populações; H_o: heterozigidade observada; H_e: heterozigidade esperada; f: índice de fixação e t_a: taxa de cruzamento aparente.

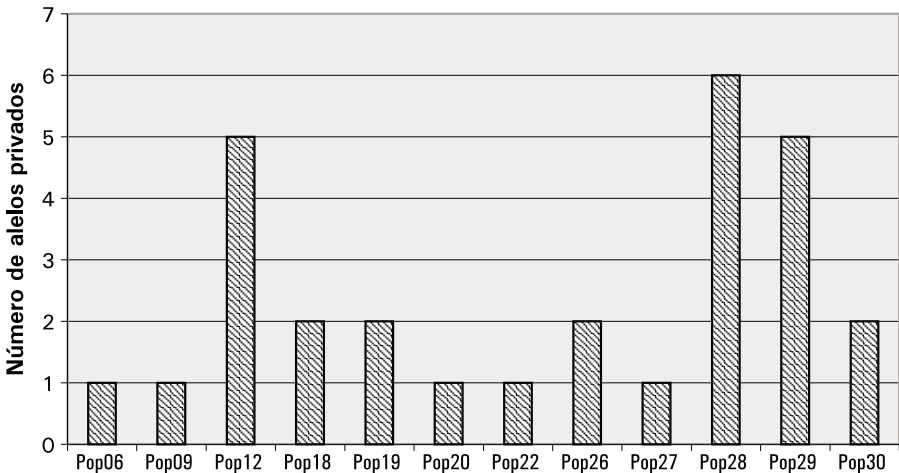


Fig. 3. Frequência de alelos privados a partir de 103 alelos obtidos em dez locos polimórficos de marcadores microsatélites, em 12 populações de *Oryza glumaepatula*.

O índice de fixação (\hat{f}) e a taxa de cruzamento aparente (\hat{t}_a) estimados conjuntamente para as 30 populações foram de 0,761 e 13,5%, respectivamente (Tabela 3). Analisando-se individualmente cada Bioma, os valores de \hat{f} encontrados foram de 0,929, 0,688 e 0,797, e os valores de \hat{t}_a foram de 3,6%, 18,4% e 11,3% para os Biomas Amazônia, Pantanal e Cerrado, respectivamente (Tabela 3).

Analisando as 30 populações de *O. glumaepatula* com os dez locos SSRs, a endogamia total da espécie (\hat{F}_{IT}) encontrada foi de 0,968 (Tabela 4). O índice de fixação geral (\hat{F}_{IS}) foi estimado em 0,794, o qual diferiu significativamente de zero através do método de reamostragem com *bootstrap*, indicando uma elevada endogamia dentro de cada população de *O. glumaepatula*. As estatísticas F_{ST} (Wright, 1931) e R_{ST} (Slatkin, 1995), que fornecem uma medida da diversidade genética entre populações naturais assumindo modelos diferentes de evolução dos locos SSR, foram de 0,847 e 0,901, respectivamente. Estas estimativas foram congruentes, indicando, com base nesses valores, que a maior parte da variabilidade genética está contida entre populações (Tabela 3). Separadamente para cada Bioma, a diversidade entre populações foi menor no Bioma Pantanal ($\hat{F}_{ST} = 0,713$) e maior no Bioma Cerrado ($\hat{F}_{ST} = 0,868$) (Tabela 5). O fluxo gênico (Nm) entre as populações, calculado com base nas estimativas de \hat{R}_{ST} (Tabela 4), foi de 0,0268, ou seja, um migrante a cada 38 gerações, indicando uma baixa taxa de migração geral de pólen, semente e plantas flutuantes.

Tabela 4. Estimativa das estatísticas F de Wright, de R_{ST} e do número de migrantes por geração (Nm) em 30 populações de *Oryza glumaepatula*. Intervalo de confiança de 95% de probabilidade.

	\hat{F}_{IS}	\hat{F}_{IT}	\hat{F}_{ST}	\hat{R}_{ST}	Nm
Estimativa	0,794	0,968	0,847	0,901	0,0268
Superior	0,865	0,978	0,883		
Inferior	0,679	0,958	0,805		

F_{IS} = índice de fixação intrapopulacional; F_{IT} = índice de endogamia total.

Tabela 5. Estimativa das estatísticas F de Wright e do número de migrantes por geração (Nm), considerando as 30 populações de *Oryza glumaepatula*, separadas por Bioma. Intervalo de confiança de 95% de probabilidade.

Estimativa	\hat{F}_{IS}	\hat{F}_{IT}	\hat{F}_{ST}	Nm
Amazonas	0,897	0,983	0,831	0,051
Pantanal	0,762	0,932	0,713	0,100
Cerrado	0,808	0,974	0,868	0,038

F_{IS} = índice de fixação intrapopulacional; F_{IT} = índice de endogamia total.

O dendrograma baseado no coeficiente de J & C, incluindo as 30 populações (Figura 4), reflete claramente a formação de agrupamentos de acordo com os locais de coleta. Um grupo é formado pelas populações da Região Amazônica e Cerrado (vereda intacta) e Aruanã, e o outro com as populações do Pantanal e Cerrado (vereda represada). A análise de distância genética indicou que a população 1 e 2 são as mais próximas geneticamente (0,00) e as populações 23 e 28 são mais divergentes entre si (0,6905). Somente quatro populações pertencentes ao Bioma Cerrado (20, 21, 22 e 23), que ocupam áreas geográficas vizinhas, formaram um grupo distinto.

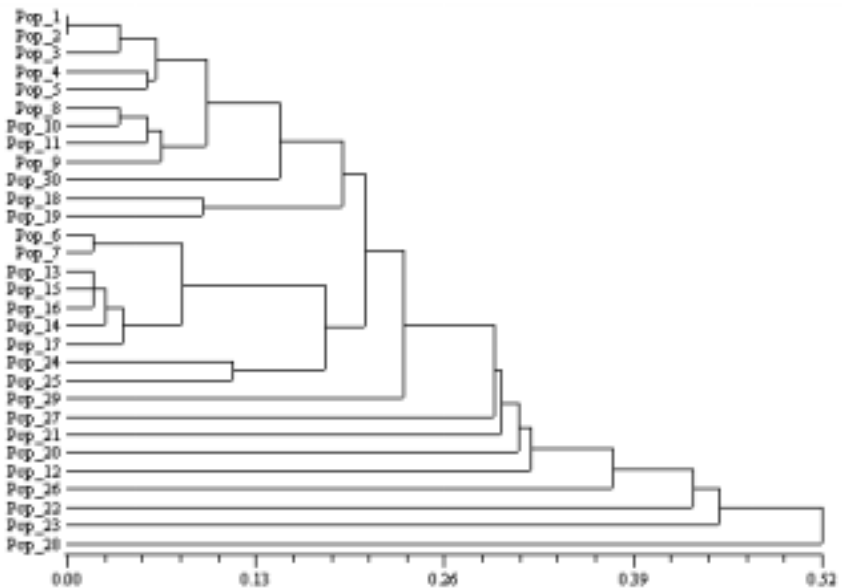


Fig. 4. Padrão de divergência genética entre 30 populações de arroz silvestre, definido pelo agrupamento UPGMA, obtida a partir do coeficiente de distâncias genéticas de J & C.

Discussão

O conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de *O. glumaepatula* é essencial para a adoção de estratégias visando à conservação deste germoplasma em condições *ex situ* e *in situ* e para

seu uso potencial em cruzamentos interespecíficos no programa de melhoramento genético do arroz.

Os dez locos SSRs analisados apresentaram um elevado multialelismo, com uma média de 10,3 alelos por loco gênico. O valor médio do conteúdo informativo destes marcadores, medidos pelo PIC (Polymorphism Information Content), foi de 0,76, próximo ao PIC de 0,65 encontrado por Ishii et al. (2001), utilizando 24 locos SSR para genotipar cinco acessos de *O. glumaepatula*, e bem superior ao estimado para populações *O. glumaepatula* com base em quatro locos isoenzimáticos (0,21) (Buso et al., 1998).

Estudos de variabilidade genética de populações de *O. glumaepatula* conduzidos até o momento utilizaram marcadores com menor conteúdo informativo, como isoenzimas (Akimoto et al., 1998; Buso et al., 1998) e RAPDs (Buso et al., 1998). Buso et al. (1998), estudando quatro populações silvestres de *O. glumaepatula* do Brasil através de marcadores isoenzimáticos, verificou que a heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,00 a 0,025 (média de 0,006) e a heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,00 a 0,21 (média de 0,062). De acordo com Gottlieb (1981), a heterozigosidade observada (H_o) de 0,00 a 0,008, obtida por marcadores isoenzimáticos, são indicativas de espécies com hábito reprodutivo autógamo. No presente trabalho, a heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,00 a 0,16, com uma média de 0,027, e foi bem menor do que a heterozigosidade esperada (H_e), que variou de 0,00 a 0,559, com uma média de 0,115. As estimativas de H_e e H_o obtidas por Buso et al. (1998) diferiram das estimativas encontradas no presente trabalho, e o principal fator provavelmente foi o tipo de marcador utilizado em cada trabalho. Marcadores isoenzimáticos, utilizados por Buso et al. (1998), são muito menos informativos que marcadores SSR, podendo subestimar o número e frequência de alelos de populações silvestres e conduzir a estimativas de parâmetros populacionais menos precisas. As estimativas obtidas com populações coletadas no Brasil sugerem que a espécie *O. glumaepatula* tem hábito reprodutivo preferencialmente autógamo. Estas estimativas, calculadas separadamente por Bioma, apresentaram heterozigosidade esperada (H_e) mais elevada no Pantanal (0,257), indicando maior diversidade gênica entre estas populações. Os valores de heterozigosidade esperada (H_e) sempre foram maiores que os da heterozigosidade observada (H_o) para os três Biomas separadamente, evidenciando um excesso de homozigotos e corroborando estudos de diversidade genética realizados previamente com *O. glumaepatula* (Buso et al., 1998; Endo & Morishima, 1983).

As populações 22 e 23 apresentaram as maiores diversidades gênicas (H_e) e taxas de cruzamento em relação às demais (Tabela 2). Estas populações foram coletadas em áreas de várzeas do Cerrado no Estado de Goiás onde, em anos anteriores, houve cultivo comercial de arroz irrigado com as cultivares Metica 1 e Cica 8. A proximidade entre as áreas de cultivo comercial e as populações naturais pode ter sido a responsável por ter ocasionado o fluxo gênico, e conseqüentemente, aumentado a H_e .

Outro exemplo da interferência do homem na variabilidade genética de populações de *O. glumaepatula* foi evidenciada pela diferença entre o número de alelos exclusivos encontrados nas populações de Itapirapuã, quando agrupadas em vereda represada (antropizadas) e vereda intacta. Foram identificados 29 alelos privados ou exclusivos na população de vereda represada, comprovando-se deste forma que esta área sofreu maior interferência humana que a vereda intacta, onde foram identificados 14 alelos. Estes alelos privados ou exclusivos surgem em populações onde o fluxo é restrito, desta forma, os resultados deste trabalho são congruentes com a condição do local onde foram realizadas as coletas, com maior ou menor nível de antropização da região de Cerrados.

Analisando os três Biomas (Tabela 3), verifica-se que a taxa de cruzamento das populações coletadas no Pantanal foi a mais alta (18,4%). Apesar da grande possibilidade de ocorrência de fluxo gênico entre populações localizadas nas bacias hidrográficas das Regiões Amazônica e Pantanal, devido ao desprendimento de plantas e flutuação destas entre os diversos rios, este evento aparentemente não aumentou o fluxo gênico. Contudo, deve-se salientar que somente duas populações foram analisadas no Bioma Amazônia, sendo esta amostragem restrita, quando comparada com as cinco populações do Bioma Pantanal e 23 do Bioma Cerrado, o que provavelmente contribuiu para a obtenção de diferentes taxas de fecundação cruzada de 3,6%, 18,4% e 11,3%, respectivamente. Morishima & Oka (1970), estudando duas populações de *O. glumaepatula*, encontraram a taxa de cruzamento variando de 20% a 50%. Buso et al. (1998) analisando quatro populações da mesma espécie coletadas na Amazônia e no Pantanal através de isoenzimas e marcadores RAPD, obtiveram taxas de fecundação cruzada variando de 0% a 6,0%.

Os elevados índices \hat{F}_{ST} (0,847) e \hat{R}_{ST} (0,901) obtidos indicam que a maior parte da variabilidade genética existente está contida entre as populações,

corroborando todas as estimativas reportadas para espécies de hábito preferencialmente autógamo (Frankel et al., 1998). À medida que as populações tornam-se mais isoladas e o fluxo gênico é reduzido, a deriva genética tende a manifestar-se dentro delas pela fixação de diferentes alelos, resultando na perda de variação genética intrapopulacional e no aumento da divergência genética entre elas.

Separadamente para cada Bioma, a diversidade entre populações foi menor no Pantanal ($\hat{F}_{ST} = 0,713$) e maior no Cerrado ($\hat{F}_{ST} = 0,868$), indicando que estas estão sofrendo maior antropização. A maior interferência do homem nas áreas de Cerrado, pela expansão da agricultura e pecuária, provavelmente é a principal causa da maior diversidade entre as populações silvestres de *O. glumaepatula*, uma vez que ocorre a subdivisão delas, tornando-as altamente endogâmicas. Nas populações coletadas nas áreas de várzeas do Cerrado, onde predomina o isolamento geográfico, a dispersão de pólen e sementes fica comprometida, limitando e mesmo impedindo o fluxo gênico entre populações. O motivo de a estimativa de \hat{F}_{ST} ter sido menor no Bioma Pantanal que no Bioma Cerrado pode ser devido, provavelmente, à pequena distância geográfica entre as populações do Pantanal, permitindo o fluxo de genes ou indivíduos entre populações, havendo maior compartilhamento de alelos. Esta diversidade entre populações (F_{ST}) é uma medida de endogamia devida à subdivisão e portanto, estes resultados, quando comparados para os três diferentes Biomas, são concordantes com a geografia e localização destas populações. As populações do Bioma Amazônia possuem uma diversidade intermediária entre populações em relação aos outros dois Biomas. Esta observação também se justifica pela disposição do relevo, pois no Bioma Pantanal e Amazônico estas populações estão localizadas em várzeas inundadas e leito de rios, e no Bioma Cerrado elas encontram-se em vales represados e, portanto, com menor possibilidade de fluxo gênico.

O índice de endogamia total da espécie (\hat{F}_{IT}) foi de 96,8% (Tabela 4), o que explica os elevados desvios em relação às frequências de Hardy-Weinberg pelo elevado número de homozigotos encontrados. Os desvios previstos nestes valores indicam a ocorrência de associações não casuais entre alelos em locos gênicos, constituindo o desequilíbrio de ligação. Resultados similares indicando uma elevada tendência de endogamia em populações de *O. glumaepatula*, ocorrendo na Região Amazônica e na Bacia do Rio Paraguai, foram obtidos por Akimoto et al. (1998) e Buso et al. (1998). O índice F_{IT}

quando separado por Bioma, foi menor para o Bioma Pantanal, sendo concordante com o menor índice de diversidade entre as populações ali observadas. Desse modo, de alguma forma, seja por semente, planta ou pólen, há neste Bioma um maior fluxo gênico, quando comparado com os demais. É importante salientar que esta estimativa pode estar sofrendo desvio por efeito de amostragem, pois só foram utilizadas duas populações para o cálculo destas estimativas.

A partir das estimativas dos parâmetros populacionais, foi observada uma alta endogamia e relativamente baixa diversidade dentro de populações de *O. glumaepatula*. Entretanto, a variação genética entre as populações está compensando a homogeneidade dentro delas. Sendo assim, a extinção de populações locais acarretaria grande perda da diversidade genética nesta espécie. Na região Amazônica, devido ao difícil acesso e às áreas de ocorrência não serem favoráveis à agropecuária, há muito menor risco de devastação das populações de *O. glumaepatula*. Contudo, nas regiões de Cerrado e Pantanal, este risco é iminente, devido à fragmentação das áreas, resultantes da expansão da fronteira agrícola e pecuária. Desse modo, são necessárias expedições de coleta adicionais nas áreas de maior risco para identificar, coletar e preservar *ex situ* a variabilidade genética existente. Com a continuidade deste trabalho, e baseando-se nos dados de diversidade genética encontrados, poderão ser indicadas áreas de ocorrência de *O. glumaepatula* importantes para a preservação da espécie e que também possam ser utilizadas como fontes de genes de interesse agrônomo para o arroz. O efeito da incorporação de segmentos de DNA de *O. glumaepatula* em cultivares de arroz tem produzido linhagens mais produtivas (Xiao et al., 1998; Brondani et al., 2002). Além disto, existe a possibilidade de serem transferidos genes específicos de tolerância a estresses bióticos. Foram coletadas populações de *O. glumaepatula* desenvolvendo-se em locais com elevadas concentrações de alumínio (2,5 ppm), na Fazenda Córrego Fundo, e elevadas concentrações de ferro (594 ppm), na Fazenda Santo Antônio. No momento estão sendo conduzidos estudos para a transferência de genes relacionados à tolerância a estresses de alumínio e ferro destas populações para cultivares comerciais de arroz. A extinção de populações de *O. glumaepatula*, além de diminuir a diversidade da espécie, também acarretará a perda de importantes genes que poderiam ser utilizados no programa de melhoramento genético do arroz.

Referências Bibliográficas

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 7, p. 1071-1077, Nov 1996.

AKIMOTO, M.; SHIMAMOTO, Y.; MORISHIMA, H. Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by its life-history traits. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 10, p. 1371-1381, Oct. 1998.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 196, n. 1, p. 80-83, Jul. 1991.

BRAR, D. S.; KHUSH, G. S. Alien introgression in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1/2, p. 35-47, Sept. 1997.

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 and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, 6/7, p. 1192-1203, May 2002.

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 *O. glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, Lund, v. 134, n. 1, p. 59-71, Oct. 2001.

BUSO, G. S. C.; RANGEL, P. H. N.; 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, n. 1, p. 107-117, Jan. 1998.

CHEN, X.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; MCCOUCH, S. R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 4, p. 553-567, Sept. 1997.

COELHO, A. S. G. **Dboot**: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores (software). Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2001.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, Essex, v. 83, n. 6, p. 748–756, Dec. 1999.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1987.

ENDO, T.; MORISHIMA, H. Rice. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B, p. 129-146.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 100 p.

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, n. 9, p. 881-885, Sept. 1997.

GOTTLIEB, L. D. Electrophoretic evidence and plant populations. **Progress in Phytochemistry**, Oxford, v. 7, p. 1-46, 1981.

ISHII, T.; XU, Y.; MCCOUCH, S. R. Nuclear- and chloroplast-microsatellite variation in A-genome species of rice. **Genome**, Ottawa, v. 44, n. 4, p. 658-666, Aug. 2001.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1/2, p. 25-34, Sept. 1997.

LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 93, n. 4, p. 287-291, July/Aug. 2002.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). Free program. Disponível em: < <http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/2000>> . Acesso em: 2000.

MILLER, M. **TFPGA** (Tools For Population Genetic Analyses). Version 1.3: a windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data. Disponível em: < <http://iubio.bio.indiana.edu:7780/archive/00000446/>> . Acesso em: 1997.

MORISHIMA, H.; OKA, H. A survey of genetic variations in the populations of wild *Oryza* species and their cultivated relatives. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 45, n. 5, p. 371-385, Oct. 1970.

ROHLF, F. J. **NTSYS-Pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter, 1989. 180 p. (Exeter Software).

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Maryland, v. 139, n. 1, p. 457-462, Jan. 1995.

TEMNYKH, S.; PARK, W. D.; AYRES, N.; CARTINHO, S.; HAUCK, N.; LIPOVICH, L.; CHO, Y. G.; ISHII, T.; MCCOUCH, S. R. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 5, p. 697-712, Mar. 2000.

XIAO, J.; LI, J.; GRANDILLO, S.; AHN, S. N.; YUAN, L.; TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. **Genetics**, Maryland, v. 150, n. 2, p. 899-909, Oct. 1998.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II**: methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

WRIGHT, J. M.; BENTZEN, P. Microsatellites: genetic markers of the future. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 4, p. 384-388, 1994.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, Maryland, v. 16, p. 97-159, Mar. 1931.

