

69. IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES DO GENE ALS E DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA EM ARROZ VERMELHO RESISTENTE AOS HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS ATRAVÉS DE MARCADORES SNAP

Ana Carolina Roso¹, Aldo Merotto Jr.², Carla Andréa Delatorre², Nestor Saldain³, Valmir Gaedke Menezes⁴, Bianca Silva Assis⁵

Palavras-chave: Controle seletivo, *Oryza sativa* L., Resistência

INTRODUÇÃO

O arroz vermelho é a principal planta daninha infestante da cultura do arroz irrigado no Rio Grande do Sul (RS). Entre os prejuízos causados está a diminuição da produção de arroz influenciando a economia da cadeia produtiva orizícola. O controle seletivo do arroz vermelho com herbicidas na cultura do arroz era impossibilitado devido ao fato de que ambas plantas pertencem a mesma espécie. O desenvolvimento de cultivares resistentes aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas possibilitou o controle químico do arroz vermelho de forma seletiva na cultura do arroz. Entretanto, plantas de arroz vermelho resistentes a estes herbicidas foram encontradas em lavouras de arroz do RS em um período inferior a 5 anos do início da utilização desta tecnologia. Recentemente foi realizado um estudo de monitoramento da ocorrência de arroz vermelho resistente a herbicidas imidazolinonas em lavouras comerciais do RS onde foram analisadas 228 amostras de sementes (MENEZES *et al.*, 2008). Neste trabalho, foi constatado que 55,7% das amostras analisadas apresentaram indivíduos resistentes ao herbicida imazethapyr + imazapic. Estes resultados indicaram a grande frequência da ocorrência de arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas. O surgimento de biótipos de arroz vermelho resistentes pode ocorrer em função do fluxo gênico a partir de cultivares de arroz resistentes, ou por processo de evolução independente gerado pela pressão de seleção ocasionada pelo uso contínuo de um mesmo herbicida. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar a mutação do gene ALS existente em populações de arroz vermelho como forma de determinação do mecanismo de resistência a herbicidas através de análises moleculares com marcadores do tipo 'single nucleotide amplified polymorphism' (SNAP).

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado neste trabalho constou de amostras de sementes de arroz vermelho coletadas em áreas de lavouras de arroz do RS com ausência de controle através do herbicida Only (imazethapyr + imazapic). Este material foi cedido pelo setor de Herbologia do Instituto Rio Grandense do Arroz e corresponde a 16 populações de arroz vermelho coletadas na safra 2006/07 e, 22 populações coletadas na safra de 2007/08. A informação dos níveis de resistência ao herbicida nas populações de 2006/07 foram obtidas no trabalho publicado por Menezes *et al.*, (2008). A confirmação da resistência nas populações de 2007/08 foi recentemente realizada pelo mesmo grupo de pesquisa e encontra-se em fase de publicação (Menezes, Mariot e Oliveira, comunicação pessoal).

O material vegetal da safra 2006/07 constituiu-se das seguintes populações, com os respectivos locais de origem apresentados entre parênteses: 198NB (Cacequi), 172NB (Rosário do Sul), 38NB (Palmares do Sul), 182NB (Restinga Seca), 133NB (Caçapava do Sul), 53NA (Guaíba), 60NB (Cachoeira do Sul), 98 NB (Viamão), 144NB (São Francisco de Assis), 15NB (Alegrete), 22NA (Palmares do Sul), 04NB (Rio Pardo), 223 NB (Santa Maria), 75NB (São Lourenço do Sul), 109NB (São Pedro do Sul) e 31NB (Rio Grande). O material vegetal da safra 2007/08 constituiu-se das seguintes populações com respectivos locais de origem entre parênteses: 267NB (Rosário do Sul), 265NB

¹ Eng. Agrônoma, estudante do curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS, Av. Bento Gonçalves 7712, 91740-000. Porto Alegre-RS. Email: roso_ac@yahoo.com.br.

² UFRGS

³ INIA-Uruguai

⁴ IRGA

⁵ ULBRA.

(Rosário do Sul), 136NB (Agudo), 66NB (Alegrete), 47NM (Caçapava do Sul), 48NM (São Martinho da Serra), 49NM (São Martinho da Serra), 50NM (Santa Maria), 51NM (Santa Maria), 274NM (Uruguaiana), 207MA (Camaquã), 201MA (Camaquã), 212MA (Dona Francisca), 208MA (Camaquã), 206MA (Camaquã), 32AN (Restinga Seca), 235AN (São Gabriel), 90NA (Cachoeira do Sul), 124NA (Novos Cabrais), 25NA (Restinga Seca), 135NA (Dona Francisca), 66NA (Alegrete). Ambos os grupos de populações foram classificados quanto ao nível de resistência através da avaliação visual da fitointoxicação resultante da ação do herbicida, utilizando-se as doses de 75 + 25 e 150 + 50 g ha⁻¹ i.a, de imazethapyr + imazapic, respectivamente. As testemunhas utilizadas foram as cultivares resistentes IRGA 422CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL e a cultivar suscetível IRGA 417. Esta classificação originou as denominações dos níveis de resistência como: nível baixo (NB), nível médio (NM), nível médio-alto (MA) e nível alto de resistência (NA). Foram utilizadas 208 plantas referentes à safra de 2006/07, e 273 plantas da safra 2007/08, totalizando 481 plantas. A identificação do tipo de mutação que ocorreu nestas populações foi realizada através de marcadores moleculares SNAP, os quais discriminam as mutações das cultivares de arroz IRGA 422CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL, cujas mutações presentes são G₆₅₄E, S₆₅₃D e A₁₂₂T, respectivamente. Estes marcadores foram obtidos a partir de trabalhos anteriores (ROSO *et al.*, 2008) onde foram utilizadas as cultivares acima descritas como referência.

A extração do DNA foi realizada conforme o protocolo de Haberer *et al.* (1996). As reações de PCR utilizando os marcadores SNAPS desenvolvidos em trabalhos anteriores (ROSO *et al.*, 2008) seguiram o seguinte protocolo: 50 ng de DNA, 0,166 µM de cada sequência nucleotídica iniciadora (*forward* e *reverse*), 0,166 mM deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 0,2 U de Taq DNA polimerase, 1x tampão, 1,3 µL de DMSO 100% e 1,5 mM de cloreto de magnésio, em um volume total de 30 µL por reação. As reações de PCR foram sujeitas a 3 minutos de desnaturação a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, e 1,5 minutos a 72°C, e por fim 10 min a 72°C. Os produtos da reação de PCR foram separados em gel de agarose (2 %) corado com brometo de etídeo na proporção de 0,02 µL.ml⁻¹, por 120 minutos a 110 V em tampão TBE 0,5X (40mM Tris, 1mM EDTA, pH=8,0). Após, cada gel foi fotografado com o auxílio do programa KODAK DIGITAL SCIENCE 1D.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fenotípica da resistência das populações analisadas indicou que o nível de resistência foi alto, médio e baixo em 12, 37 e 50% para as populações de 2006/07 e alto, médio-alto, médio e baixo nível em 32, 23, 27 e 18% para as populações de 2007/08, respectivamente (Figura 1). Destaca-se que o nível médio-alto de resistência só foi avaliado nas populações de arroz vermelho resistente provenientes da safra 2007/08.

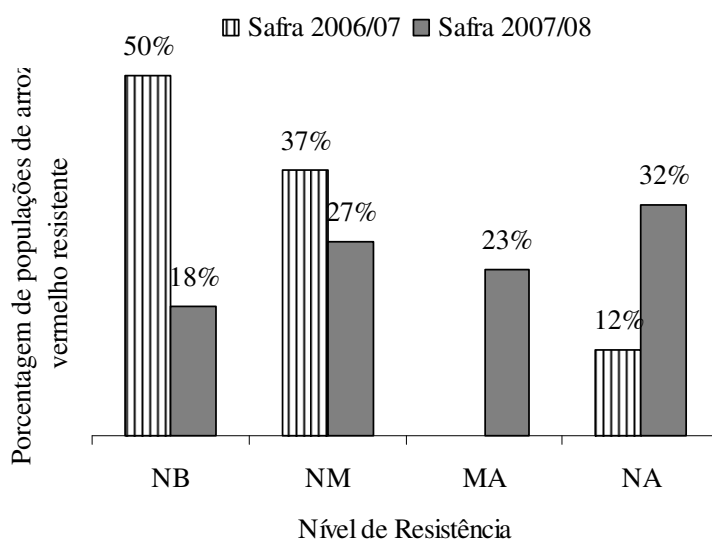


FIGURA 1. Nível de resistência de 16 e 22 populações de arroz vermelho coletadas como escape em lavouras comerciais de arroz irrigado no RS, nas safras 2006/07 e 2007/08, respectivamente, sendo: NB = nível baixo; NM = nível médio; MA = nível médio-alto; NA = nível alto. IRGA / EEA, 2009.

As mutações S₆₅₃D, A₁₂₂T e G₆₅₄E estão presentes nas cultivares SATOR CL, PUITÁ INTA CL e IRGA 422CL, respectivamente (ROSO *et al.*, 2008). Os marcadores SNAP, a semelhança dos marcadores SNP, permitem a identificação precisa de alteração de um certo nucleotídeo em relação a uma sequência padrão, e são utilizados como ferramenta para diagnóstico de resistência de plantas a herbicidas (DÉLYE *et al.*, 2002) e de insetos a inseticidas (TSAGKARAKOU *et al.*, 2009). Os resultados obtidos com estes marcadores indicaram que a mutação S₆₅₃D foi diagnosticada com o marcador SNPSatFW1 (Figura 2A), a A₁₂₂T com o SNPPtaRev1 (Figura 2B) e a G₆₅₄E com o SNP422FW1 (Figura 2C). A análise da distribuição das mutações do gene ALS nas 481 plantas analisadas foi realizada contabilizando a frequência de cada mutação entre e dentro das populações estudadas. A análise demonstrada na Tabela 1 refere-se a frequência de populações que apresentaram ao menos uma planta com a determinada mutação, ou seja, a frequência entre populações. Por outro lado, a frequência média de plantas dentro de cada população que apresentam certa mutação é apresentada na Tabela 2. A mutação G₆₅₄E foi a de maior ocorrência tanto entre as populações (Tabela 1) como dentro das populações (Tabela 2). Ainda, também foram encontrados indivíduos contendo as outras duas mutações, S₆₅₃N e A₁₂₂T, isoladas ou em combinação (Tabela 1 e 2).

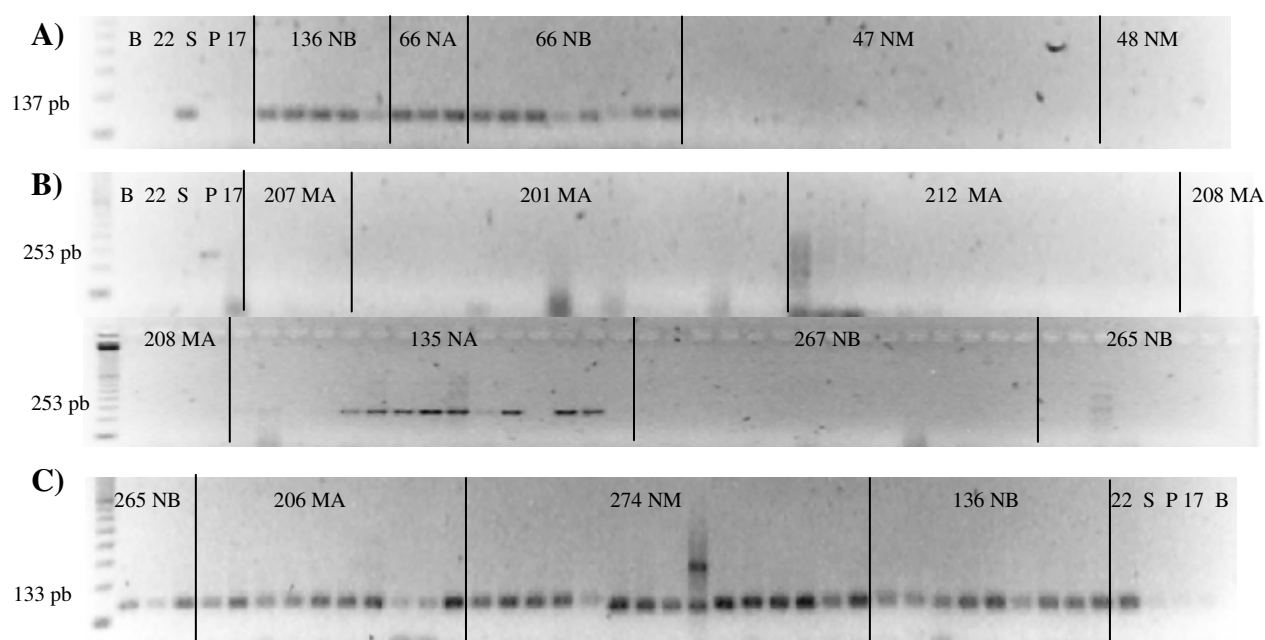


FIGURA 2. Reações de PCR utilizando os marcadores SNAPs em populações de arroz vermelho resistentes oriundas da safra 2007/08. A) SNPSatFW1 (137 pb) em: branco (B), IRGA 422CL (22), SATOR CL (S), PUITÁ INTA CL (P) e IRGA 417 (17), e nas populações de arroz vermelho resistente: 136 NB, 66 NA, 66 NB; B) SNPPtaRev1 (253 pb) em: branco (B), IRGA 422CL (22), SATOR CL (S), PUITÁ INTA CL (P) e IRGA 417 (17), e na população de arroz vermelho resistente: 135 NA; C) SNP422FW1 (133 pb) em: branco (B), IRGA 422CL (22), SATOR CL (S), PUITÁ INTA CL (P) e IRGA 417 (17), e nas populações de arroz vermelho resistente: 265 NB, 206 MA, 274 NM e 136 NB.

TABELA 1. Frequência (%) entre populações com pelo menos uma planta de arroz vermelho resistente, devido as mutações G₆₅₄E, S₆₅₃D e A₁₂₂T, no gene ALS, coletadas nas safras 2006/07 e 2007/08. UFRGS, 2008.

Mutações	Safra 2006/07	Safra 2007/08
G ₆₅₄ E	94	91
S ₆₅₃ D	50	23
A ₁₂₂ T	31	9
G ₆₅₄ E e S ₆₅₃ D	18	14
G ₆₅₄ E e A ₁₂₂ T	12	5
A ₁₂₂ T e S ₆₅₃ D	6	0

Estes resultados indicam que a resistência aos herbicidas Imidazolinonas nas populações de arroz vermelho avaliadas deve-se, em sua maioria, a alteração do local de ação na enzima ALS, provocado pela mutação G₆₅₄E. A elevada frequência da mutação G₆₅₄E, nas populações de arroz vermelho resistentes, pode ser explicada em função da grande utilização da cultivar IRGA 422CL nas

lavouras orizícolas gaúchas, sugerindo desta forma, que a provável origem da resistência seja devido ao fluxo gênico entre a cultivar IRGA 422CL e o arroz vermelho. Recentemente, a mesma mutação encontrada na cultivar IRGA 422CL, G₆₅₄E, foi identificada em biótipos de arroz vermelho resistente no Estado do Arkansas (SALES *et al.*, 2008), porém estes autores concluíram que esta evolução da resistência se deu por um processo de evolução independente ocasionada pela pressão de seleção do herbicida, sendo esta conclusão fundamentada no fato de encontrarem, nos mesmos biótipos, a presença de uma outra mutação.

TABELA 2. Frequência (%) média dentro das populações de arroz vermelho resistente, devido as mutações G₆₅₄E, S₆₅₃D e A₁₂₂T no gene ALS, coletadas nas safras 2006/07 e 2007/08. UFRGS, 2008.

Mutações	Safra 2006/07	Safra 2007/08
G ₆₅₄ E	59	88
S ₆₅₃ D	10	32
A ₁₂₂ T	14	34
G ₆₅₄ E e S ₆₅₃ D	12	8
G ₆₅₄ E e A ₁₂₂ T	8	7
A ₁₂₂ T e S ₆₅₃ D	7	0

CONCLUSÕES

A resistência a herbicidas inibidores de ALS presente em populações de arroz vermelho resistentes coletados como escapes nas lavouras orizícolas do RS nas safras 2006/07 e 2007/08 está associada ao mecanismo de resistência de local de ação alterado. Estas populações apresentam mutações do tipo G₆₅₄E, S₆₅₃N e A₁₂₂T. A mutação G₆₅₄E é a de maior ocorrência nas populações estudadas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de mestrado ao primeiro autor, a FONTAGRO e ao CNPq pelo apoio financeiro, e ao IRGA pelo fornecimento do material vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DÉLYE, C.; CALMES, E.; MATÉJICEK, A. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl-CoA-carboxylase inhibiting herbicides. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.104, n.6-7, p.1114-1120, 2002.
- HABERER, G.; FISCHER, T. C.; TORRES-RUIZ, R. A. Mapping of the Nucleolus Organizer Region on Chromosome 4 in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 250, n.1, p.123-128, 1996.
- MENEZES, V. G.; KALSING, A.; MARIOT, C. H. P. Monitoramento da resistência do arroz-vermelho em áreas cultivadas com o sistema de produção Clearfield. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 26., 2008, Ouro Preto. **Anais...Ouro Preto:SBCPD**, 2008. 1 CD-ROM.
- SALES, M. A.; SHIVRAIN, V. K.; BURGOS, N. R.; KUK, Y. I. Amino acid substitutions in the acetolactate synthase gene of red rice (*Oryza sativa*) confer resistance to imazethapyr. **Weed Science**, Champaign, v.56, p.485-489, 2008.
- ROSO, A. C.; MEROTTO Jr., A.; DELATORRE, C. A.; FISCHER, A.J.; SALDAIN, N. Determinação do mecanismo de resistência e das mutações do gene ALS em cultivares de arroz resistentes a herbicidas para identificação de híbridos através de marcadores SNP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 26., 2008, Ouro Preto. **Anais...Ouro Preto:SBCPD**, 2008. 1 CD-ROM.
- TSAGKARAKOU, A.; NIKOU, D.; RODITAKIS, E.; SHARVIT, M. Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and organophosphate resistance mutations in the Q biotype of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v 94, 49-54. 2009.