

## BIOENSAIOS PARA DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA A HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS EM CULTIVARES DE ARROZ

Ana Carolina Roso<sup>(1)</sup>, Aldo Merotto Junior<sup>(1)</sup>, Carla Andréa Delatorre<sup>(1)</sup>. <sup>1</sup>Faculdade de Agronomia-UFRGS, AV. Bento Gonçalves, 7712. 91501-970. Porto Alegre, RS. Email: roso\_ac@yahoo.com.br

A resistência a herbicidas pertencentes ao grupo dos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) tem evoluído em grandes proporções em comparação com herbicidas de outros mecanismos de ação. Ainda, diversas culturas resistentes a este mecanismo de ação foram recentemente desenvolvidas (Tan et. Al., 2005). Diversas técnicas baseadas no crescimento de plantas e em parâmetros bioquímicos e moleculares vêm sendo aprimoradas para a confirmação da ocorrência da resistência (Corbett and Tardiff, 2006), e assim, proporcionar a correta execução de programas de manejo visando a prevenção e contenção deste problema quando ocorrendo em plantas daninhas ou para monitoramento de cultivares resistentes.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver bioensaios para o diagnóstico da resistência a herbicidas do grupo químico das imidazolinonas em diferentes etapas do desenvolvimento do arroz.

Os experimentos foram conduzidos em estufa e no laboratório do Departamento de Plantas de Lavoura, da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Os bioensaios realizados foram: germinação de sementes, crescimento de afilhos e a germinação de grãos de pólen em cultivares de arroz resistentes e suscetíveis a herbicidas imidazolinonas. As cultivares de arroz utilizadas foram IRGA 417, suscetível (S), e a IRGA 422CL, resistente (R) a herbicidas deste grupo. O herbicida utilizado foi imazapic (25 g ia.L<sup>-1</sup>) + imazethapyr (75 g ia.L<sup>-1</sup>).

O primeiro bioensaio realizado foi o da germinação de sementes. Para este experimento foram determinadas curvas de dose-resposta, sendo que as concentrações utilizadas foram: 0; 0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 mM. Após 24 horas de embebição nas soluções, as sementes foram dispostas em papel para germinação e em seguida colocadas em câmara do tipo BOD na temperatura de 24°C. As avaliações aconteceram aos 7 dias após a transferência das sementes para o papel germinador. Foram avaliados o comprimento do coleóptilo e a porcentagem de germinação. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado num esquema fatorial (9 doses x 2 cultivares), com três repetições, totalizando 54 unidades experimentais. Os dados foram analisados pelo pacote "drc" do programa "R" (Ritz et al. 2006) através do ajuste da equação logística, onde  $Y$  representa o comprimento do coleóptilo ou porcentagem da germinação expressos como porcentagem da testemunha não tratada,  $c$  e  $d$  representam os limites inferiores e superiores da curva respectivamente,  $b$  é a declividade da curva no ponto em que esta produz a metade da resposta (chamada  $GR_{50}$ ) entre os valores inferiores e superiores. O fator de resistência (FR) foi obtido pela relação do  $GR_{50}$  entre a cultivar R e S.

O segundo bioensaio constou da avaliação do crescimento de raízes de afilhos submetidos ao herbicida inibidor da ALS. Primeiramente, as sementes das cultivares de arroz foram semeadas em estufa e mantidas sob condições ideais de desenvolvimento. Quando os afilhos estavam com aproximadamente 4 folhas, estes foram removidos do colmo principal e conduzidos para laboratório. Foram avaliados diferentes tratamentos abrangendo a manutenção ou retirada das raízes ou parte aérea e doses do herbicida para discriminação entre cultivares R e S. Foram testadas soluções a base de água ou solução nutritiva, e o efeito de auxina como promotora do crescimento de raízes. Em relação à remoção de partes dos afilhos foram avaliados afilhos inteiros (raiz e parte aérea), com a remoção das raízes e manutenção da parte aérea intacta, com a manutenção de apenas 1 cm de raiz e parte aérea intacta, e manutenção de apenas 2 cm de parte aérea e 1 cm de

raízes. As doses de discriminação testadas foram: 0; 0,00002; 0,0002; 0,002; 0,02; 0,2 e 2,0 M do herbicida imazethapyr.

O terceiro bioensaio constou da germinação de grãos de pólen em solução contendo herbicida. Inicialmente foram analisadas concentrações de ingredientes da solução de germinação, sendo  $H_3BO_3$  (50, 100 e 150  $mg\ L^{-1}$ )  $CaNO_3$  (100, 200 e 300  $mg\ L^{-1}$ ) e sacarose (200, 300 e 400  $g\ L^{-1}$ ). Ainda, foram avaliadas soluções contendo agar (0,3 e 0,5 %) ou somente água destilada. A inibição diferencial da germinação de grãos de pólen em cultivares R e S foi avaliada em soluções contendo 0; 0,1; 10; 100 e 1000  $\mu M$  de imazethapyr. Plantas das cultivares avaliadas foram obtidas da forma descrita anteriormente. No estágio de florescimento, panículas foram coletadas às 8:30 horas, acondicionadas em recipientes contendo água e transportadas para laboratório. Procedeu-se o acompanhamento da evolução da antese a cada 15 minutos. Duas horas e meia após a coleta das panículas, a antese era máxima, e neste momento realizou-se a coleta dos grãos de pólen. Esta coleta ocorreu através de leve toque manual nas panículas de forma que os grãos de pólen caíssem sobre uma Placa de Petri contendo a solução para germinação. Placas de Petri contendo as soluções tratamento em avaliação receberam 5 mL da solução contendo os grãos de pólen. Após, as Placas de Petri foram incubadas em câmara do tipo BOD a 26°C por 4 horas. A avaliação da germinação dos grãos de pólen ocorreu com o auxílio de lupa. Utilizou-se o corante carmim propiônico para a visualização da germinação. Considerou-se germinados os grãos de pólen que apresentavam o tubo polínico com mais de 5 vezes o tamanho do grão de pólen.

No ensaio de germinação de sementes o comprimento do coleóptilo foi um bom parâmetro na expressão da suscetibilidade ao herbicida (Figura 1a). As melhores doses de discriminação entre a cultivar R e S foram 0,1 e 0,01 mM. O fator de R indica que a cultivar R IRGA 422 CL foi 31 vezes mais resistente que a cultivar S IRGA 417 (Tabela 1). A percentagem de germinação não expressou a diferença de suscetibilidade entre as cultivares avaliadas (Figura 1b). Houve redução da germinação do arroz na dose de 10 mM igualmente para ambas as cultivares (Figura 1b). O método da embebição de sementes mostrou-se um teste rápido, preciso e não trabalhoso para detecção de plantas tolerantes a herbicidas inibidores da ALS em arroz. Este método pode ser utilizado em estudos para a identificação da hibridização de arroz, como por exemplo, no fluxo gênico do gene de resistência a herbicidas ALS entre cultivares resistentes e a planta daninha arroz vermelho.

Os resultados do bioensaio de crescimento de filhotes indicam que a melhor emissão de raízes ocorreu nas plantas onde foram removidas as raízes e mantida a parte aérea intacta. O tratamento de manutenção da parte aérea e raízes intactas não demonstrou efeito diferencial entre as cultivares R e S. Os tratamentos de manutenção de apenas 1 cm de raízes e parte aérea intacta e manutenção de 2 cm de parte aérea e 1 cm de raízes foram intermediários. A melhor dose de discriminação entre indivíduos R e S foi a 0,02 M (Figura 2).

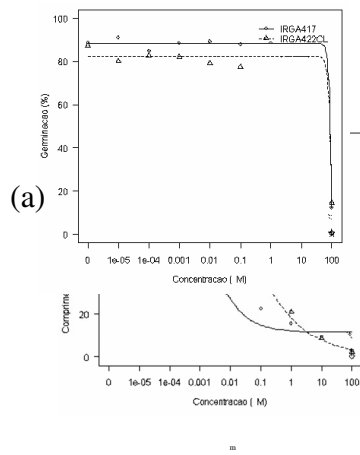
No bioensaio de germinação de grãos de pólen a composição da solução que apresentou melhores resultados foi com de 150  $mg\ L^{-1}$  de  $H_3BO_3$ , 200  $mg\ L^{-1}$  de  $CaNO_3$  e sacarose 200  $g\ L^{-1}$  diluídos em água. Ainda, as concentrações de herbicida utilizadas se mostraram promissoras para a determinação quantitativa através de curva dose-resposta.

Os resultados obtidos permitiram a identificação das condições ótimas requeridas para cada bioensaio e as concentrações herbicidas necessárias para a identificação de indivíduos R e S a herbicidas inibidores da enzima ALS.

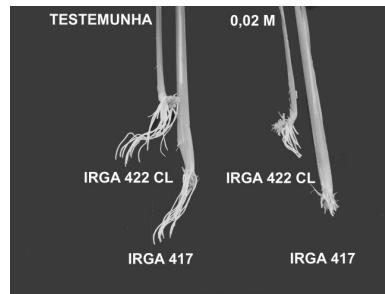
#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Corbett, C. A. L.; Tardif, F. J. 2006. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. *Pest Management Science*, 62:584-597.
- Ritz, C.; Streibig, J. C.; Cedergreen, N. 2006. Statistical assessment of dose-response curves with free software Collection of examples. Department of Natural Sciences.

Department of Agricultural Sciences, Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. Tan, S.; Evans, R.R.; Dahmer, M.L.; Singh, B.K.; Shaner, D.L. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. Pest management science. 61:246-257.



**Figura 1.** Curvas dose-resposta ao herbicida imazapic + imazethapyr para o comprimento do coleóptilo (a) , e porcentagem de germinação (b) de biótipos de arroz resistente (IRGA 422 CL) e suscetível (IRGA 417) a herbicidas imidazolinonas.



**Figura 2.** Observação visual de doses referenciais de discriminação entre plantas R e S a herbicidas do grupo dos inibidores da ALS no bioensaio de crescimento de afilhos.

**Tabela 1.** Parâmetros da equação logística e fator de resistência relativo ao efeito de doses do herbicida imazapic + imazethapyr sobre o comprimento do coleóptilo no bioensaio de embebição de sementes.

Cultivares	Declividade	Limite inferior	Limite superior	GR <sub>50</sub>
IRGA 417	0,73**	11,71**	104,63**	0,001**
IRGA 422CL	0,45**	0,57 <sup>ns</sup>	99,89**	0,033*
Fator de resistência	Estimado	Desvio-padrão	t	P

(GR <sub>50</sub> IRGA 422 CL/ GR <sub>50</sub> IRGA 417)	31,075	12,872	2,337	0,021
--	--------	--------	-------	-------

\*\* P < 0,01; \* P < 0,05; <sup>ns</sup> não-significativo