

IDENTIFICAÇÃO DO LOCAL DE AÇÃO ALTERADO COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE CAPIM-ARROZ A HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS

Everton Danilo Bortoly¹; Catarine Markus²; Aldo Merotto Jr.³

Palavras-chave: *Echinochloa spp.*, Sequenciamento, Dose-resposta.

INTRODUÇÃO

O capim-arroz (*Echinochloa spp.*) é uma das principais plantas daninhas da cultura do arroz. Esta invasora possui alto poder de competição com o arroz cultivado, sendo que infestações de 40 plantas m⁻² de capim-arroz reduzem o rendimento dos grãos de 50 a 70% (Fischer *et al.*, 1997). Devido a essa elevada redução há necessidade do seu controle que na maioria das vezes é realizado com uso de herbicidas. Os herbicidas inibidores da ALS correspondem aos produtos mais utilizados na maioria das culturas. No entanto, o uso contínuo destes herbicidas, juntamente com os problemas de manejo da cultura do arroz, contribuiu para a evolução da resistência das plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS.

A enzima ALS atua na rota bioquímica de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. O mecanismo de resistência das plantas daninhas aos herbicidas pode ser devido superexpressão ou alteração da enzima alvo ou não relacionado ao local de ação devido a principalmente, incremento da metabolização, alteração na absorção e translocação, ou compartimentalização do herbicida. Local de ação alterado resulta em uma redução da afinidade da enzima pelo herbicida e geralmente aumenta a insensibilidade a outros herbicidas do mesmo grupo químico e mecanismo de ação. Essa alteração ocorre devido a uma mutação que na maioria das vezes é decorrente de uma substituição dos aminoácidos e que pode ocorrer em um ou em vários locais do gene ALS (Shaner, 1999). Este mecanismo é responsável pela maior frequência dos casos relatados de resistência aos herbicidas. A identificação do mecanismo de resistência é importante para a correta determinação de práticas de manejo relacionadas a prevenção ou ao controle de plantas daninhas resistentes a herbicidas.

Populações de capim-arroz das principais regiões produtoras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul (RS) e de Santa Catarina (SC) tem apresentado resistência aos herbicidas do grupo das imidazolinonas (Merotto *et al.*, 2009). Resultados preliminares confirmaram que em uma população de capim-arroz resistente ao imazethapyr possui resposta aos inibidores de metabolização indicando a participação desse processo como mecanismo de resistência aos herbicidas. Porém, esse resultado não foi encontrado em outras cinco populações avaliadas (Matzenbacher, 2012). Deste modo, o objetivo desse trabalho foi sequenciar o gene ALS de populações de capim arroz, de forma a identificar a ocorrência de local de ação alterado como mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS.

MATERIAL E MÉTODOS

O primeiro experimento consistiu na avaliação do efeito do herbicida imazethapyr com aplicações foliares em plantas de capim-arroz, e o segundo experimento consistiu

¹ Mestrando, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, edbortoly@yahoo.com.br

² Doutoranda, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Professor do Departamento de Plantas de Lavoura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

em isolar e sequenciar o gene ALS de capim-arroz e comparar a sequência de biótipos resistentes e suscetível com sequências deste gene.

O material vegetal utilizado nos dois experimentos corresponde a seis populações de capim-arroz (Tabela 1). Dessas populações, uma é suscetível à herbicida, três são resistentes apenas aos herbicidas inibidores da ALS e duas populações apresentam resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e ao herbicida quinclorac. A suscetibilidade e resistência a herbicidas dos biótipos analisados foram comprovadas em estudos anteriores (Merotto Jr. et al., 2009, Matzenbacher, 2012). Todas as populações foram autofecundadas por uma geração. As sementes foram germinadas em câmara de crescimento e transplantadas para copos plásticos de 200ml, furoados e preenchidos com terra previamente adubada com 500kg.ha⁻¹ de N-P-K na fórmula 5-20-20. Após o transplante, os copos foram alocados em bandejas com lâmina d'água de 5cm e conduzidas em casa-de-vegetação. Quando as plantas apresentavam duas folhas foi realizado o desbaste deixando uma planta por vaso.

Tabela 1. Origem dos biótipos utilizados para determinação do mecanismo de resistência, com a respectiva resistência aos herbicidas inibidores da ALS e quinclorac, e se apresenta resposta à resistência por metabolização.

População	Origem	Resistência a inibidores da ALS	Resistência a quinclorac	Mecanismo de Resistência
SUSSP	São Paulo/SP	Não	Não	Não Apresenta
PALMS	Palmares do Sul/RS	Sim	Não	Metabolização P450
CAMAQ	Camaguã/RS	Sim	Não	Desconhecido
ARRGR	Arroio Grande/RS	Sim	Sim	Metabolização P450
CACHS	Cachoeira do Sul/RS	Sim	Não	Metabolização P450
MOSTS	Mostardas/RS	Sim	Sim	Desconhecido

Para o experimento de curva dose-resposta os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental de blocos completos casualizado em um esquema fatorial com 3 repetições. O fator A foi composto pelos biótipos resistente e suscetível, descritos na Tabela 1. O fator B corresponde às doses de 0, 25, 50, 75, 100, 200, 500, 1000 e 2000g.i.a.ha⁻¹ do herbicida imazethapyr (Pivot) equivalente a 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 5, 10 e 20 vezes a dose de campo, respectivamente, acrescido do surfactante Dash na dose de 0,5% v/v. Os tratamentos foram realizados quando as plantas atingiram o estádio de 2-3 folhas verdadeiras. A avaliação da massa seca da parte aérea foi avaliada aos 23 Dias Após Aplicação (DAA). Aos 23 DAA, a parte aérea das plantas foi coletada e colocada para secar em estufa com temperatura de aproximadamente 60°C até atingir peso constante, para posterior pesagem das amostras. Os dados foram expressos em porcentagem da média da testemuña e foi realizada análise de variância (ANOVA) através do teste F com nível de significância a 1% de probabilidade. A complementação da análise de variância foi feita pela equação log-logística ou sigmoidal de quatro parâmetros.

O estudo referente ao isolamento e sequenciamento do gene ALS foi iniciado pela avaliação de vários *primers* que foram desenhados a partir do alinhamento de várias espécies monocotiledôneas. Procurou-se escolher os *primers* que proporcionassem fragmentos de aproximadamente 500pb para obter maior clareza e melhor informação sobre a sequência.

As amostras para extração de DNA foram obtidas de 150mg de tecido foliar, com quatro repetições por população (Tabela 1). As extrações de DNA genômico foram realizadas conforme protocolo CTAB. As amplificações de PCR foram conduzidas utilizando termocicladores Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf) e as reações foram adaptadas de Merotto (2009) e seguiram o seguinte protocolo: 50ng de DNA; 0,15µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,2mM de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 0,35 U de Taq DNA polimerase, 1,3% de DMSO 100%, 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 1X PCR buffer e água MiliQ para completar volume total de 30µL. O protocolo da reação de PCR foi composta por 3 minutos de desnaturação das cadeias de DNA a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C para ocorrer o anelamento, 90

segundos a 72°C para ocorrer a extensão da fita complementar do DNA e por fim 10 minutos a 72°C para amplificar fragmentos mais longos. Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose (2%) corados com brometo de etídio na proporção de 0,02 $\mu\text{L ml}^{-1}$, por 120 minutos a 110 V em tampão TBE. Após, cada gel foi fotografado com auxílio do programa L-PIX IMAGE Release 2.6 (Loccus Biotecnologia). O sequenciamento do DNA foi realizado através do equipamento 3730XL (Applied Biosystems), no laboratório da empresa MACROGEN Inc. (Gasan-dong, Geumchen-gu Seoul, Korea).

Os resultados foram alinhados através do programa CLUSTAL W, disponível na URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html> (EBI, 2008). O alinhamento foi feito com as sequências conhecidas do gene ALS de *Arabidopsis thaliana* (X51514) e *O. sativa* (AB049822) e observado a ocorrência de mutações conhecidas do gene ALS relacionadas com a resistência a herbicidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de Variância (ANOVA) do teste F demonstrou interação significativa entre biótipos x dose ($p \leq 0,01$) para as avaliações de massa seca da parte aérea. Deste modo, todas as curvas de dose-resposta das populações avaliadas foram ajustadas pela equação logística de quatro parâmetros (Figura 1). A avaliação de massa seca realizada aos 23 DAA confirmou que os biótipos PALMS, ARRGR e MOSTS apresentam resistência ao herbicida imazethapyr, os quais apresentaram um GR₅₀ (dose necessária para redução de 50% do crescimento) de respectivamente 147, 122 e 514 g.ha⁻¹. Para essas populações o nível de controle aumentou com o incremento da dose do herbicida, obtendo controle de 100% nas populações PALMS e ARRGR com dose de imazethapyr maiores ou igual a 500 g.ha⁻¹ e para a população MOSTS o controle não ultrapassou os 70% na dose máxima. As demais populações foram controladas com 25 g.ha⁻¹, que equivale a ¼ da dose recomendada para este herbicida (Figura 1).

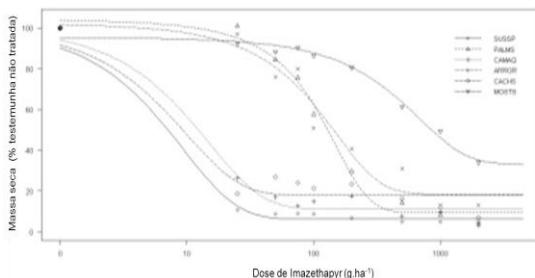


Figura 1. Redução da massa seca da parte aérea (%) de seis biótipos de capim-arroz, em relação à testemunha não tratada, em função de diferentes doses de imazethapyr, aos 23 DAA.

Os fragmentos obtidos a partir dos primers avaliados (Tabela 2) resultaram em sequência de DNA que correspondem ao gene ALS das espécies *Arabidopsis thaliana* (X51514) e *O. sativa* (AB049822), com similaridade de 67 e 87%, respectivamente. Entretanto, a região inicial do gene ALS que não foi obtida, necessitando o desenho de novos primers para amplificar essa região inicial do gene ALS.

As sequências obtidas confirmaram que as regiões de domínio B e E apresentam mutações que conferem resistência para as populações MOSTS e PALMS, respectivamente. Na região do domínio B correspondente ao aminoácido Triptofano W₅₇₄ ocorreu uma mutação da base nitrogenada Guanina por Timina, acarretando em uma alteração do aminoácido Triptofano (TGG) para Leucina (TTG) (Figura 6a). Da mesma forma, na região do domínio E ocorreu mutação na posição central do códon

referente ao aminoácido serina S₆₅₃ para asparagina, (Figura 2b). A região dos domínios B e E da população suscetível são apresentadas nas Figura 2c e 2d. Essas mutações são encontradas em diversas plantas daninhas, como por exemplo, *Amaranthus powellii* e *Setaria viridis* (Heap, 2013) e indicam a ocorrência de local de ação alterado como mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores de ALS. Nas populações de capim arroz MOSTS e PALMS. Nas populações SUSSP, CAMAQ e CACHS não foram encontradas mutações nas regiões de domínio avaliadas associadas à resistência a herbicidas.

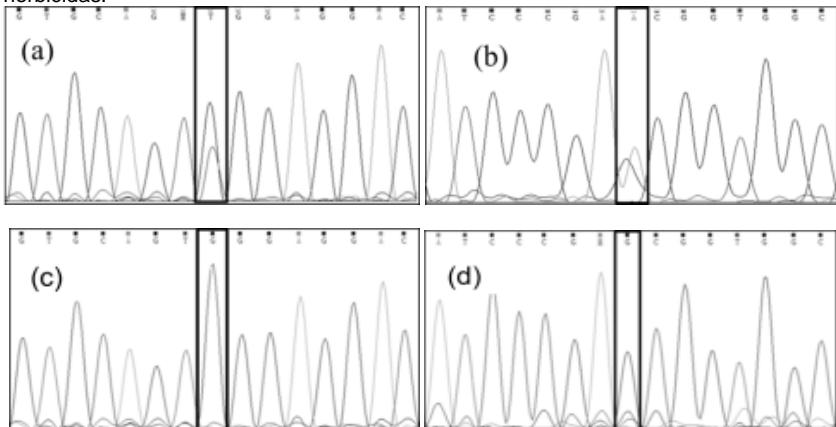


Figura 2. Cromatograma do sequenciamento do gene ALS de capim-arroz, indicando heterozigose na região de domínio B (a) e E (b) para as populações MOSTS e PALMS, respectivamente quando comparado com a suscetível (SSUSP) (c) e (d) para as mesmas regiões.

CONCLUSÃO

A resistência ao herbicida imazethapyr em populações de capim arroz está associada a mutações do gene ALS que indicam a ocorrência de alteração de local de ação como mecanismo de resistência. Este processo em conjunto com a prévia identificação de incremento de metabolização de herbicidas em capim arroz indica a ocorrência de grande complexidade da resistência a herbicida nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FISCHER, A., RAMIREZ, H.V., LOZANO, J.. Suppression of junglerice [*Echinochloa colona* (L.) Link] by irrigated rice cultivars in Latin America. *Agron. J.* 89, 516–521. 1997
 HEAP, I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: <http://www.weedscience.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx>. Acesso 5 jun. de 2013.
 MATZENBACHER, F. **Caracterização e controle de capim-arroz (*echinochloa crus-galli*) resistente aos herbicidas do grupo das imidazolinonas e quinclorac em arroz irrigado.** 2012, 212 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia com ênfase em Herbologia, UFRGS, Porto Alegre, 2012.
 MEROTTO JR, A ; KUPAS, V. ; NUNES, A. L. ; COSTA, R. F. . Resistência de capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. In: VI Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2009, Porto Alegre. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado.** Posto Alegre : Palotti, p. 312-315. 2009.
 SHANER, D.L. Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection and management. **Weed Science**, Champaign, v.44, n.3, p.405–411, 1999.