

ORIGEM DA RESISTÊNCIA DE ARROZ VERMELHO AOS HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS

Goulart, I.C.G.R.¹; Merotto Jr., A.²

Palavras-chave: acetohydroxyacid synthase, fluxo gênico; *Oryza sativa*, pressão de seleção.

INTRODUÇÃO

As cultivares de arroz e arroz vermelho resistentes às imidazolinonas vêm sendo utilizadas amplamente no Brasil desde 2003. As mutações na enzima ALS responsáveis pela resistência às imidazolinonas nas cultivares IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL é Ala₁₂₂Thr é Gly₆₅₄Glu respectivamente, nas cultivares híbridas, é Ser₆₅₃Asn (ROSO *et al.*, 2010). A associação de herbicidas imazethapyr+imazapic foi introduzida junto a cultivar IRGA 422 CL para controle do arroz vermelho e outras espécies de plantas daninhas na cultura do arroz. No entanto, o uso continuado destes herbicidas exerce alta pressão de seleção sobre biótipos de arroz vermelho, contribuindo para surgimento de populações resistentes. Além disso, existe a possibilidade de incorporação da resistência a inibidores de ALS no arroz vermelho pelo fluxo gênico a partir das cultivares de arroz. Vários biótipos de arroz vermelho resistente a inibidores de ALS foram identificados no Brasil (MENEZES *et al.*, 2009), cujo mecanismo de resistência encontrado foi local de ação alterado (ROSO *et al.* 2010). As mutações presentes nos genes da ALS dos biótipos de arroz vermelho resistentes foram, em sua maioria, iguais aos das cultivares de arroz resistentes utilizadas. Entretanto, a origem da resistência nos biótipos de arroz vermelho nestas populações não é conhecida. A determinação da predominância e da magnitude dos processos seleção de mutações e fluxo gênico é importante para indicar a necessidade de intensificação de estratégias de prevenção e manejo da resistência do arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas. O objetivo deste trabalho foi elucidar a proporção do fluxo gênico e da evolução independente como processos de origem da resistência de arroz vermelho às imidazolinonas no RS.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS. O material vegetal utilizado correspondeu a 176 indivíduos oriundos de 15 populações de arroz vermelho resistentes às imidazolinonas coletados na safra 2007/08. Adicionalmente, foram utilizadas como controle, as cultivares IRGA 417, IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL, e híbridos obtidos por cruzamentos artificiais entre estas cultivares e quatro biótipos de arroz vermelho. O DNA das amostras foi obtido de 150mg de tecido foliar de cada planta utilizando-se protocolo de extração padrão. Inicialmente, foram selecionados os marcadores RM106, RM180, RM234, RM253, RM251, RM34, RM475 (www.gramene.org) e 4797 (BRUNES *et al.*, 2007). A avaliação do polimorfismo dos marcadores SSR foi realizada com base na comparação visual dos alelos encontrados em cada locus para as cultivares de arroz IRGA 422 CL, IRGA 417, PUITÁ INTA CL e SATOR CL, acessos de arroz vermelho e os híbridos entre estes materiais. As PCRs foram realizadas com base no seguinte protocolo: 25 ng de DNA; 0,3 µL de cada iniciador (forward e reverse); 150µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 0,5 U de Taq DNA polimerase; 1x buffer e; 0,6 mM de MgCl₂, em um volume total de 12 µL por reação. As reações foram sujeitas a 5 min de desnaturação a 94°C, 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 56, 57 ou 60°C, dependendo do marcador, 1min a 72°C e 10min a 72°C. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados pela comparação visual com marcador de 100pb (Invitrogen). Com o objetivo de aumentar a precisão da análise genotípica dos acessos de arroz vermelho resistentes foi utilizada a técnica de marcação

¹ Eng Agr MSc, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, goulart@ufrgs.br

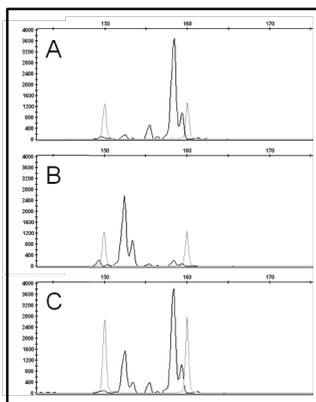
² Eng Agr PhD, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, merotto@ufrgs.br

dos fragmentos com fluoróforo através do oligonucleotídeo iniciador universal M13 conhecida como M13 Tail PCR, conforme descrito por Schuelke (2000). As reações de PCR, nesta etapa, seguiram o seguinte protocolo: 25 ng de DNA; 0,2 μM de cada iniciador forward com cauda M13; 0,8 μM de cada iniciador reverse; 0,8 μM de M13 marcado com 6-FAM; 0,150 μM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 0,5 U de Taq DNA polimerase; 1x buffer e; 0,6 mM de MgCl₂, em um volume total de 12 μL por reação. As reações foram sujeitas a 5 min de desnaturação a 94°C, 30 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 56, 57 ou 60°C, dependendo do marcador, 1min a 72°C; 8 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 53°C, dependendo do marcador, 1min a 72°C e 10min a 72°C. A genotipagem dos acessos foi realizada pelo laboratório Macrogen (Seul, Coreia do Sul) através de sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems).

A análise genotípica para determinação da origem da resistência dos acessos de arroz vermelho aos herbicidas imidazolinonas foi realizada com marcadores moleculares SSR através de análise de paternidade por exclusão (SLAVOV *et al.*, 2005). Os alelos observados nos indivíduos de arroz vermelho foram comparados com aqueles observados nas cultivares de arroz e plantas de arroz vermelho suscetíveis às imidazolinonas. A origem da resistência foi considerada como seleção independente quando um indivíduo possui somente alelos típicos de arroz vermelho e ou da cultivar IRGA 417. A presença de mutações em indivíduos com estas características indica seleção da mutação pelo uso contínuo dos herbicidas imidazolinonas. Por outro lado, a origem da resistência por fluxo gênico foi considerada quando um indivíduo apresentou ao menos um alelo típico de quaisquer cultivares resistentes às imidazolinonas. Isso porque após um evento de fluxo gênico o indivíduo gerado apresenta a maioria dos alelos em heterozigose. Entretanto, nas gerações seguintes de autofecundação a homozigose aumenta e alguns alelos são perdidos. As mutações no gene da ALS foram utilizadas como auxiliares no diagnóstico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os marcadores RM106, RM180 e RM234 não foram capazes de distinguir polimorfismos entre as cultivares de arroz e o arroz vermelho no presente estudo. Além disso, o marcador RM253 não foi consistente nas ampliações e, por isso, foi excluído do ensaio. Por outro lado, os marcadores 4797, RM251, RM341 e RM475 apresentaram perfil polimórfico entre o arroz vermelho e as cultivares de arroz. A Figura 1 ilustra os resultados da amplificação de fragmentos SSR com iniciador marcado com 6 FAM conforme o método M13 Tail PCR (SCHUELKE, 2000).



◀Figura 1. Eletroferograma dos fragmentos do marcador RM341 amplificados de IRGA 422 CL (A), arroz vermelho (B) e híbrido artificial obtido em casa de vegetação, utilizando iniciador forward com cauda M13. Os picos 150 e 160bp correspondem ao padrão ROX e os demais correspondem aos alelos amplificados na PCR.

Os marcadores SSR confirmaram os cruzamentos artificiais, que apresentaram os alelos dos respectivos parentais arroz vermelho e cultivar (Tabela 1). Entretanto, foi detectado que o cruzamento da cultivar IRGA 417 com o arroz vermelho não foi bem sucedido, pois os quatro loci foram homozigotos, contendo os alelos iguais ao da planta de arroz vermelho (Tabela 1). A cultivar SATOR CL é um híbrido e conforme esperado, apresentou heterozigose nos marcadores testados, exceto no marcador 4797 que foi homozigoto (Tabela 1). A cultivar SATOR CL apresentou dois alelos iguais aos da planta de arroz vermelho com a qual foi realizado o cruzamento. Estes alelos ocorreram nos locus RM251 e

RM475 e, assim, o híbrido oriundo do cruzamento destas plantas poderia ser homocigoto nestes loci. De fato, isso ocorreu com o marcador RM251, que foi monomórfico na genotipagem do híbrido entre AV104 e SATOR CL (Tabela 1). O mesmo ocorreu com o híbrido de AV120 e PUITÁ INTA CL, que foi homocigoto para o marcador RM475 (Tabela 1).

Tabela 1. Genotipagem de cultivares de arroz, arroz vermelho e híbridos realizados em casa de vegetação, com quatro marcadores SSR.

População ¹	Marcador molecular SSR				Mutaçao
	4797	RM341	RM251	RM475	
IRGA 422 CL	129/129	157/157	129/129	212/212	Gly ₆₅₄ Glu
AV122	135/135	152/152	151/151	202/202	-
AV122 x IRGA 422 CL	129/135	152/157	129/151	202/212	Gly ₆₅₄ Glu
PUITÁ INTA CL	129/129	187/187	129/129	202/202	Ala ₁₂₂ Thr
AV120	135/135	152/152	147/147	202/202	-
AV120 x PUITÁ INTA CL	129/135	152/187	129/147	202/202	Ala ₁₂₂ Thr
SATOR CL	129/129	157/187	129/143	202/212	Ser ₆₅₃ Asn
AV104	135/135	152/152	143/143	202/202	-
AV104 x SATOR CL	129/135	152/187	143/143	202/212	Ser ₆₅₃ Asn
IRGA 417	135/135	187/187	129/129	212/212	-
AV110	135/135	152/152	143/143	202/202	-
AV110 x IRGA 417	135/135	152/152	143/143	202/202	-
Arroz vermelho suscetível	129/129	175/175	129/129	202/202	-

O alelo 129 do marcador 4797 está presente nas cultivares resistentes às imidazolinonas e ausente na cultivar suscetível IRGA 417. Esse alelo está presente em todas as populações de arroz vermelho avaliadas e com frequências relativamente altas (dados não apresentados). O alelo 135 desse marcador foi encontrado na cultivar IRGA 417 e no arroz vermelho utilizados nos cruzamentos (Tabela 1). Assim, esse alelo foi associado a esta cultivar e à suscetibilidade às imidazolinonas. O marcador RM251 indicou diversos alelos ausentes nas cultivares, sendo considerados típicos de arroz vermelho (Tabela 1). Os alelos 157 e 187 encontrados no locus RM341 foram considerados típicos das cultivares de arroz avaliadas. Esses alelos estão presentes na cultivar SATOR CL em heterocigose (Tabela 1). No locus RM475, o alelo 202 foi observado em homocigose na cultivar PUITÁ INTA CL, enquanto que nas cultivares IRGA 417 e IRGA 422 CL o alelo observado foi o 212. O alelo 216 foi considerado típico de arroz vermelho, devido sua ausência nas cultivares avaliadas.

A resistência aos herbicidas imidazolinonas em arroz vermelho pode ser devida ao fluxo gênico entre cultivares de arroz resistentes e arroz vermelho ou à seleção independente de fluxo gênico pelo uso contínuo desses herbicidas. Os acessos analisados no presente estudo foram fenotipados em relação à resistência aos herbicidas imidazolinonas e determinadas as mutações presentes (MENEZES et al., 2009; ROSO et al., 2010). Tanto as informações obtidas da genotipagem quanto da genotipagem dos acessos de arroz vermelho foram utilizadas para diagnosticar a origem da resistência dos mesmos. Com base nessas informações, foram identificados dois indivíduos cuja resistência aos herbicidas imidazolinonas foi originada da seleção independente de fluxo gênico, e 174 cuja resistência foi devida a fluxo gênico (Tabela 2).

Tabela 2. Origem da resistência de arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas do RS.

Origem da resistência	Indivíduos avaliados	Indivíduos identificados	Proporção (%)
Seleção independente	176	2	1,1
Fluxo gênico	176	174	98,9

Indivíduos da população Restinga Seca e São Gabriel, portadores da mutação Ser₆₅₃Asn, possuem os alelos presentes na cultivar SATOR CL que também possui esta mutação (não mostrado). Isto evidencia a ocorrência de fluxo gênico a partir desta cultivar para o arroz vermelho. Ainda, indivíduos da população Restinga Seca, portadores da mutação Ala₁₂₂Thr, apresentaram alguns alelos iguais aos que ocorrem em PUITÁ INTA CL

que contém a mesma mutação (não mostrado). Entretanto, estes alelos também pertencem à cultivar IRGA 417 e assim, não é possível definir, que a presença desta mutação nestes acessos seja devida ao fluxo gênico a partir de PUITÁ INTA CL. Um fato complicador é que o histórico de uso de cultivares nos locais onde foram coletados os indivíduos de arroz vermelho indica que não houve cultivo tanto de SATOR CL quanto de PUITÁ INTA CL anteriormente à coleta dos acessos, realizado na safra 2007/2008 (KALSING, A., comunicação pessoal). Além disso, o cultivo comercial da cultivar PUITÁ INTA CL foi liberado somente no ano de 2008/2009 no Brasil. A partir dessas informações duas possibilidades podem ter ocorrido. Uma delas é a ocorrência natural destas mutações nestes materiais. Os resultados apresentados aqui não permitem concluir que os acessos de arroz vermelho portadores das mutações Ala₁₂₂Thr e Ser₆₅₃Asn as tenham adquirido naturalmente. Esta limitação é devida em parte à presença de alelos semelhantes na cultivar IRGA 417 que são compartilhados com as demais cultivares e dificultam a definição do genitor. Outra possibilidade é que estas cultivares tenham sido utilizadas em certas áreas, no caso de SATOR CL, mas a informação oficial tenha se perdido. No caso da cultivar PUITÁ INTA CL, o uso pode ter sido realizado com sementes oriundas da Argentina, onde o cultivo comercial foi liberado anteriormente em relação ao Brasil. Por outro lado, a mutação Gly₆₅₄Glu, presente na cultivar IRGA 422 CL, ocorreu naturalmente em uma população de arroz vermelho do Arkansas (SALES *et al.*, 2008). O mesmo ocorreu com dois indivíduos estudados neste trabalho, cuja resistência foi devida à seleção independente. Esses pertencem às duas populações de São Martinho da Serra (não mostrado). A mutação no gene da ALS encontrada nestes indivíduos é a Gly₆₅₄Glu.

Considerando a ocorrência de resistência aos herbicidas em arroz vermelho devida à seleção independente, o manejo deve ser realizado com base na redução da pressão de seleção pelos herbicidas. Isso é alcançado pelo uso da rotação de culturas que permite a utilização de herbicidas de distintos mecanismos de ação (ANDRES, *et al.*, 2001). Por outro lado, a resistência de arroz vermelho originada devido ao fluxo gênico direto de cultivares resistentes aos herbicidas, o manejo deve ser baseado no controle de escapes de arroz vermelho. Para tanto, práticas como *rouging* e aplicação de herbicidas durante o florescimento do arroz vermelho devem ser utilizadas para controle de plantas de arroz vermelho (AGOSTINETTO *et al.*, 2001).

CONCLUSÃO

A origem da resistência aos herbicidas imidazolinonas nos biótipos de arroz vermelho estudados foi predominantemente devido ao fluxo gênico. Entretanto, a seleção de indivíduos resistentes por uso contínuo desses herbicidas também foi detectada.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINETTO, D., et al. Arroz vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. *Ciencia Rural*, v. 31, n., p. 341-349, 2001.
- ANDRES, A., et al. Rotação de culturas e pousio do solo na redução do banco de sementes de arroz vermelho em solo de várzea. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 7, n. 2, p. 85-88, 2001.
- BRUNES, T. O., et al. Fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado estimado por meio de marcadores de microsatélites. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 37, n. 2, p., 2007.
- MENEZES, V. G., et al. Arroz-vermelho (*Oryza sativa*) resistente aos herbicidas imidazolinonas. *Planta Daninha*, v. 27, n., p. 1047-1052, 2009.
- ROSO, A. C., et al. Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. *Field Crops Research*, v. 119, n. 1, p. 175-182, 2010.
- SALES, M. A., et al. Amino acid substitutions in the acetolactate synthase gene red rice (*Oryza sativa*) confer resistance to imazethapyr. *Weed Science*, v. 56, n. 4, p. 485-489, 2008.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.
- SLAVOV, G. T., et al. Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 10, p. 3109-3121, 2005.