

# IDENTIFICAÇÃO DO LOCAL DE AÇÃO ALTERADO COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE CAPIM-ARROZ (*Echinochloa crus-galli*) A HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS

BORTOLY, E. D. (UFRGS – Porto Alegre/RS – edbortoly@yahoo.com.br), PISONI, A (UFRGS – Porto Alegre/RS –ale\_pisoni@yahoo.com.br), BARCELOS, J. A. N. (UFRGS – Porto Alegre/RS –joseari.nene@gmail.com), MARKUS, C. (UFRGS – Porto Alegre/RS – catarine.markus@gmail.com), MEROTTO JR, A. (UFRGS – Porto Alegre/RS – merotto@ufrgs.com.br)

**RESUMO:** Resistência a herbicidas devido ao incremento de metabolização foi encontrada em algumas populações de capim-arroz, entretanto este mecanismo não foi correlacionado com a resistência em outras populações. O objetivo deste trabalho foi sequenciar o gene ALS dessas populações a fim de identificar a ocorrência de alteração no local de ação dos herbicidas inibidores da ALS (acetolactato sintase). Em um primeiro experimento foi avaliado o nível de resistência em planta e a atividade de enzima ALS em estudo de dose-resposta onde o fator A foi composto por cinco biótipos com suspeita de resistência e um suscetível, e o fator B correspondeu às doses de 0, 25, 50, 75, 100, 200, 500, 1000 e 2000 g.ha<sup>-1</sup> do herbicida imazethapyr. O segundo experimento consistiu em isolar e sequenciar o gene ALS de capim-arroz e comparar a sequência de biótipos resistentes e suscetíveis com sequências padrão deste gene. O fator de resistência dos biótipos PALMS, ARRGR e MOSTS foi de 20,07, 17,24 e 100,51, respectivamente, comprovando a resistência destes biótipos ao herbicida imazethapyr. Os biótipos MOSTS e PALMS apresentaram as mutações W<sub>574</sub>L e S<sub>653</sub>N nas regiões de domínio B e E, respectivamente. Resistência ao imazethapyr em populações de capim arroz está associada a mutações do gene ALS indicando local de ação alterado como mecanismo de resistência.

**Palavras-chave:** Acetolactato sintase, arroz, Clearfield, *Echinochloa crus-galli*, imazethapyr

## INTRODUÇÃO

O capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*) 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<sup>-2</sup> de capim-arroz reduzem o rendimento dos grãos de 50 a 70% (Fischer *et al.*, 1997). O controle de capim-arroz é realizado na maioria das situações através de herbicidas. Os herbicidas inibidores da ALS são os mais utilizados na

maioria das culturas. No entanto, o uso contínuo destes herbicidas, juntamente com os problemas de manejo da cultura do arroz, contribuíram 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. Os mecanismos de resistência das plantas daninhas aos herbicidas podem ser devido à superexpressão ou alteração da enzima alvo ou não relacionado ao local de ação devido principalmente ao 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. 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) apresentaram resistência aos herbicidas do grupo das imidazolinonas (Merotto *et al*, 2009). Resultados preliminares confirmaram que populações de capim-arroz resistentes ao imazethapyr apresentavam resposta aos inibidores de metabolização indicando a participação desse processo como possível mecanismo de resistência aos herbicidas (Matzenbacher, 2012). Porém, estes resultados não foram encontrados em outras cinco populações avaliadas no presente estudo. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram sequenciar o gene ALS de populações de capim arroz e identificar a ocorrência do 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 a atividade da enzima ALS. O segundo experimento consistiu em isolar e sequenciar o (gene ALS) de capim-arroz e comparar a sequência de biótipos resistentes e suscetíveis com sequências padrão deste gene. O material vegetal utilizado nos dois experimentos corresponde a seis populações de capim-arroz. 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 200 ml preenchidos com solo previamente adubado com 500 kg.ha<sup>-1</sup> de N-P-K na fórmula 5-20-20. Após o transplante, os copos foram alocados em bandejas com lâmina d'água de 5 cm e conduzidas em casa-de-vegetação.

Para o experimento de curva dose-resposta os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental de blocos completos casualizados em um esquema fatorial com 3 repetições. O fator A foi composto pelos biótipos resistentes e suscetíveis. O fator B corresponde às doses de 0, 25, 50, 75, 100, 200, 500, 1000 e 2000 g.ha<sup>-1</sup> 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 aplicados quando as plantas atingiram o estágio fenológico de 2-3 folhas verdadeiras. A avaliação da massa seca da parte aérea foi avaliada aos 23 dias após aplicação (DAA). A análise da atividade da enzima ALS foi realizada através do método “*in vivo*” adaptado de Gerwich *et al*, (1993). Os dados foram expressos em porcentagem da média da testemunha 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.

As amostras para extração de DNA foram obtidas de 150 mg de tecido foliar, com quatro repetições por população. 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). Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose (2%), corados com brometo de etídio na proporção de 0,02 µL ml<sup>-1</sup>, por 120 minutos a 110 V, em tampão TBE. Após esta etapa, cada gel foi fotografado com auxílio do programa L-PIX IMAGE 2.6. O sequenciamento do DNA foi realizado através do equipamento 3730XL. Os resultados foram alinhados através do programa CLUSTAL W. O alinhamento foi feito com as sequências conhecidas do gene ALS de *Arabidopsis thaliana* (X51514) e *Oryza sativa* (AB049822) e observado a ocorrência de mutações conhecidas do gene ALS relacionadas com a resistência a herbicidas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância demonstraram interação significativa entre biótipos x dose ( $p \leq 0,01$ ) para as variáveis observadas massa seca da parte aérea e atividade da enzima ALS. As curvas de dose-reposta das populações avaliadas foram ajustadas pela equação logística de quatro parâmetros. A avaliação de massa seca realizada aos 23 DAA confirmou que os biótipos PALMS01, ARRGR01 e MOSTS51 são resistentes ao herbicida e apresentaram GR<sub>50</sub> (dose necessária para redução de 50% do crescimento) de 147, 122 e 514 g.ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1, Figura 1). Dos biótipos resistentes, apenas PALMS01 e MOSTS51 apresentaram resposta no experimento de atividade da enzima ALS com I<sub>50</sub> de 86,2 e 1525,4 g.ha<sup>-1</sup>, respectivamente. O biótipo ARRGR01 que também foi resistente no experimento de dose-resposta apresentou I<sub>50</sub> de

0,236 g.i.a.ha<sup>-1</sup>, resultado que exclui local de ação alterado como mecanismo de resistência desse biótipo.

Tabela 1. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) para a variável massa seca da parte aérea de seis biótipos de capim-arroz, aos 23 DAA e da atividade da enzima ALS submetidos a diferentes doses do herbicida imazethapyr. Porto Alegre, RS. 2013

Biótipo	$b^{1/}$	$c^{2/}$	$d^{3/}$	$C_{50}$ ou $GR_{50}^{4/}$ ; $I_{50}^5$		Fator de Resistência <sup>1/</sup>	
				Dose <sup>6/</sup>	IC <sup>6/</sup> 95%	FR <sup>7/</sup>	IC <sup>10/</sup> 95%
----- Massa seca da parte aérea -----							
SUSSP01	1,2665**	3,7228**	100,67**	6,9635*	(-0,447; 14,367)		
PALMS01	2,1085**	6,0475**	97,821**	139,79**	(125,747; 153,833)	20,07*	(-1,405; 41,545)
CAMAQ01	-0,5438**	-0,0127 <sup>NS</sup>	99,999**	5,1794**	(0,433; 9,927)	0,74 <sup>NS</sup>	(-0,304; 1,784)
ARRGR01	1,8890**	9,3723**	100,97**	120,05**	(106,951; 133,149)	17,24*	(-1,203; 35,683)
CACHS50	0,9635**	6,5613**	99,668**	7,4796**	(1,564; 13,396)	1,074 <sup>NS</sup>	(0,932; 1,216)
MOSTS51	1,4743**	2,5587 <sup>NS</sup>	98,382**	699,92**	(453,299; 946,681)	100,51*	(-12,235; 213,255)
----- Atividade da enzima ALS -----							
SUSSP01	0,329**		101,58**	5,132**	(2,877; 7,386)		
PALMS01	0,329**		105,06**	86,262**	(50,303; 122,22)	16,374**	(9,687; 23,060)
CAMAQ01	0,329**		97,401**	11,67**	(6,003; 17,338)	0,862 <sup>NS</sup>	(0,355; 1,369)
ARRGR01	0,329**		99,668**	0,236**	(0,092; 0,38)	0,002**	(0,00054; 0,00526)
CACHS50	0,329**		97,621**	9,721**	(5,011; 14,431)	0,586**	(0,208; 0,964)
MOSTS51	0,329**		9,261**	1525,4**	(716,528; 2334,27)	183,06**	(107,673; 258,447)

$b^{1/}$  Declividade da curva;  $c^{2/}$  Limite inferior;  $d^{3/}$  Limite superior;  $C_{50}$  ou  $GR_{50}^{4/}$  Dose do herbicida imazethapyr que causa 50% de efeito no fator analisado; Dose<sup>6/</sup> Dose em g.ha<sup>-1</sup>; IC<sup>6/</sup> 95% Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; FR<sup>7/</sup> fator de resistência =  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  do biótipo avaliado/  $C_{50}$  ou  $GR_{50}$  do biótipo suscetível (SUSSP01).

\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; <sup>NS</sup> Não significativo a 5%.

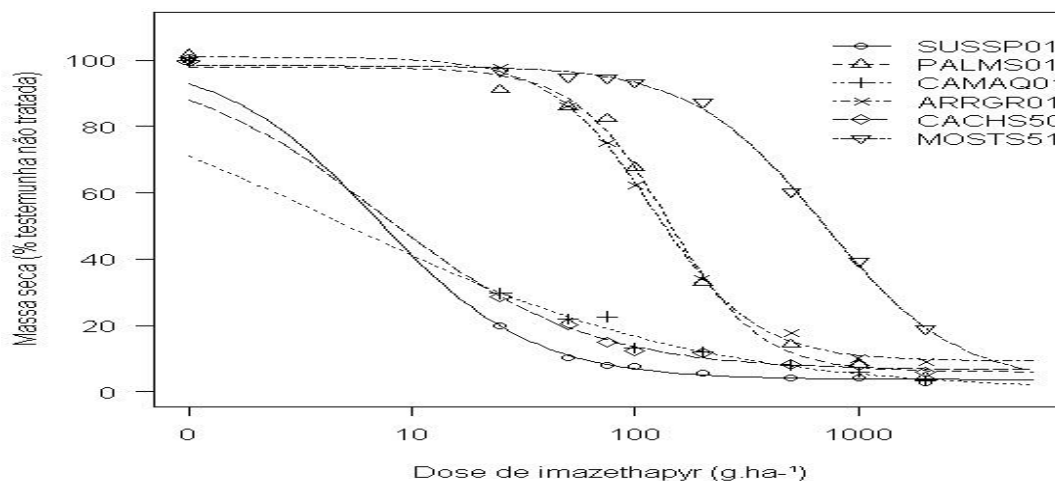


Figura 1. Redução da massa seca da parte aérea (%) de seis biótipos de capim-arroz, em relação à testemunha não tratada, em função de diferentes doses de imazethapyr, aos 23 DAA. Porto Alegre, RS. 2013.

Os fragmentos obtidos a partir dos *primers* avaliados resultaram em sequência de DNA que correspondem ao gene ALS conforme alinhamento com a sequência das espécies *A. thaliana* (X51514) e *O. sativa* (AB049822), apresentando similaridade de 67 e 87%, respectivamente. 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 W<sub>574</sub> ocorreu uma mutação da base nitrogenada Guanina por Timina, acarretando em uma alteração do aminoácido Triptofano (TGG) para Leucina (TTG) (Figura 2a). Da mesma

forma, na região do domínio E ocorreu mutação na posição central do códon referente ao aminoácido Serina S<sub>653</sub> para Asparagina, (Figura 2b). Ambas mutações foram encontradas em heterozigose. Essas mutações são encontradas em diversas plantas daninhas, como por exemplo, *Amaranthus powellii* e *Setaria viridis* (Heap, 2013). Já nas populações SUSSP, CAMAQ e CACHS não foram encontradas mutações nas regiões de domínio avaliadas associadas à resistência a herbicidas.

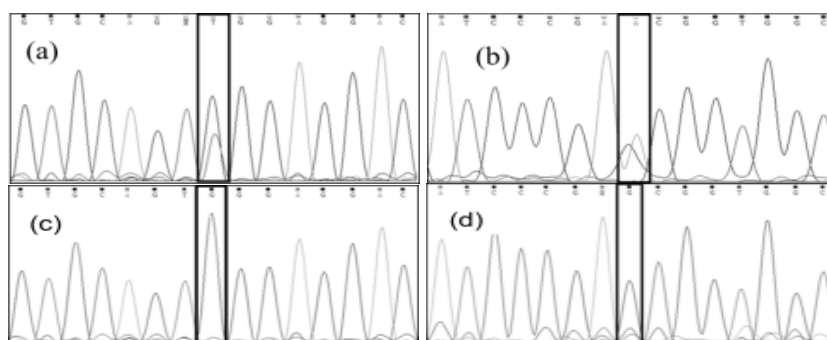


Figura 2. Cromatograma do sequenciamento do gene ALS de capim-arroz, indicando heterozigose na região de domínio B (a) e E (b) para as populações MOSTS e PALMS, respectivamente quando comparado com a suscetível (SSUSP) (c) e (d) para as mesmas regiões. Porto Alegre, RS. 2013.

## CONCLUSÕES

A resistência ao herbicida imazethapyr em populações de capim arroz está associada à 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 crus-galli*) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. In: VI Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2009, Porto Alegre. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado.** Porto 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.