

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS E DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AOS  
HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS EM ARROZ CULTIVADO E VERMELHO

Ana Carolina Roso  
Engenheira Agrônoma/UEM

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Herbologia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Maio de 2009



## DEDICO

*Aos meus pais Sérgio e Neiva, à  
minha irmã Patrícia e ao meu  
namorado João Vicente pelo apoio  
incondicional.*

*“De tudo ficam três coisas:*

*A certeza de que estamos sempre começando...*

*A certeza de que é necessário sempre continuar...*

*E então: transformar o obstáculo na busca pelo caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do sonho uma ponte e da procura um encontro.”*

*Fernando Pessoa*

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores Aldo e Carla pela dedicação atribuída durante a minha orientação no curso de mestrado, pelo estímulo e pelo conhecimento que me foi passado que vão além de conteúdos científicos, mas sim em lições para toda a vida;

Aos meus pais Sérgio e Neiva que, mesmo durante momentos difíceis, me incentivaram e motivaram a não desistir nunca dos meus objetivos, por entenderem que a separação de pais e filhos é inevitável para o crescimento dos filhos, a vocês agradeço e dedico de coração todo meu trabalho durante esses anos de curso;

À minha querida irmã Patrícia por acreditar sempre no meu potencial, por ser uma alegria e motivo de orgulho para nossa família, e ser uma fonte de motivação e de energias positivas na qual ajudaram a me fortalecer nas horas de tristeza;

Ao meu namorado João Vicente por todo incentivo, pelo apoio incondicional ao meu trabalho e pela participação ativa nesta dissertação, por entender que esta etapa faz parte da construção de nossas vidas, enfim por todo amor, compreensão, paciência, apoio e investimento dedicado a mim durante este período;

Aos meus queridos tios Celso e Mafalda por todo o carinho, apoio e pela ajuda durante a fase de adaptação a esta etapa da minha vida;

À todos os professores do Departamento de Plantas de Lavoura, em especial Ribas Antonio Vidal, André Luis Thomas e Paulo Regis F. da Silva, pelos conhecimentos passados, conselhos, pelo convívio e pelo exemplo como pessoas, fazendo com que eu continue acreditando na instituição de ensino superior como fonte de verdadeira educação e ciência;

Aos professores de outros departamentos em especial, Maria Teresa Schifino-Wittmann, Fernanda Bered e João Riboldi, pelas contribuições no aprimoramento dos meus conhecimentos;

Aos funcionários Maria Alice Weber, Marisa Carvalho Bello, Fábio Martins Berndt, Jonatan Anton e Marlene Correia da Veiga por todo apoio tanto em questões burocráticas quanto em questões pessoais, pela amizade, pelo aporte técnico; aos laboratoristas em especial por toda paciência em passarem seus conhecimentos;

À Valmir Gaedke Menezes e colaboradores do Instituto Rio Grandense de Arroz pela parceria neste trabalho;

Aos meus amigos Ives, Augusto e Anderson pela ajuda, pelas risadas, por todos os momentos de discussão científica, os quais considero enriquecedores para a minha formação;

Às minhas queridas amigas Bianca, Graciela, Fernanda, Laize, Carolina e Vladirene por todos os momentos de desabafo, pelas horas de estudo e trabalho no laboratório, por me ajudarem no trabalho na estufa, pelas confraternizações, conversas, conselhos, risadas, enfim por tudo aquilo de bom nas quais só grandes amigas como vocês podem oferecer;

Aos amigos que passaram Tonon, Fabiane, Nara, Paula, Tatiana e Thanise e a todos os demais colegas mestrandos e doutorandos do Departamento de Plantas de Lavoura pela oportunidade de conhecê-los e por toda a ajuda;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo aporte financeiro durante este curso;

À Deus por ser o guia de meus passos nessa caminhada, por colocar pessoas tão especiais na minha vida, por todas as situações proporcionadas que vieram a colaborar com meu crescimento como pessoa, por me ajudar a tornar real um dos objetivos de minha vida.

# IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS E DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS EM ARROZ CULTIVADO E VERMELHO<sup>1</sup>

Autor: Ana Carolina Roso

Orientador: Carla Andréa Delatorre

## RESUMO

O arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) é a principal planta daninha da cultura do arroz irrigado. Por pertencer à mesma espécie da planta cultivada, o controle pela utilização de herbicidas é dificultado. O desenvolvimento de cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas proporcionou o controle seletivo do arroz vermelho. Porém o uso contínuo desta tecnologia resultou no surgimento de biótipos resistentes a esses herbicidas. A presente pesquisa teve como objetivos identificar biótipos de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic em diferentes estádios do ciclo de desenvolvimento do arroz e estabelecer técnica para identificação do mecanismo de resistência utilizando marcadores moleculares do tipo ‘*single nucleotide amplified polymorphism*’ (SNAP). Os bioensaios realizados em sementes, plântulas e afilhos discriminaram de forma efetiva e rápida os indivíduos resistentes e suscetíveis, sendo desta forma, considerados técnicas expeditas no diagnóstico da resistência. As concentrações discriminadoras aos herbicidas imazethapyr + imazapic para os bioensaios de sementes, plântulas e afilhos foram 0,01 mM, 4 mM e 3 mM, respectivamente. A identificação das sequências nucleotídicas do gene ALS nas cultivares de arroz IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL indicou que as mutações G<sub>654</sub>E, S<sub>653</sub>D e A<sub>122</sub>T, respectivamente, são as responsáveis pela resistência a esses herbicidas. Estas informações, em conjunto com a sequência nucleotídica que circunda estas mutações, foram utilizadas para desenvolvimento de marcadores SNAP para identificar as possíveis mutações que conferem resistência em arroz vermelho resistente a imidazolinonas. Foram analisadas 481 plantas de 38 populações coletadas nas safras de 2006/07 e 2007/08 como escapes de controle dos herbicidas imazethapyr + imazapic. A análise fenotípica destas plantas indicou que o nível de resistência foi alto, médio e baixo em 12, 37 e 50 % para as populações de 2006/07 e em 32, 50 e 18 % para as populações de 2007/08, respectivamente. Os resultados indicaram que na maioria destas plantas, a resistência aos herbicidas é devida à insensibilidade da enzima ALS, resultante das mesmas mutações encontradas nas cultivares de arroz resistentes. A prevenção à ocorrência de plantas de arroz vermelho resistente aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas deve considerar procedimentos relacionados à diminuição da pressão de seleção causada pelo herbicida.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (96p.) Maio, 2009.

# IDENTIFICATION OF PLANTS AND RESISTANCE MECHANISM TO IMIDAZOLINONE HERBICIDES IN RICE CULTIVARS AND RED RICE

Author: Ana Carolina Roso  
Adviser: Carla Andréa Delatorre

## ABSTRACT

Red rice (*Oryza sativa* L.) is the main weed in the paddy field rice. Cultivated rice and red rice belong to the same species, resulting in difficulties for red rice control through herbicides. However, the development of imidazolinone resistant rice cultivars allowed red rice selective control. The continuous use of this technology leads to the occurrence of imidazolinone resistant red rice biotypes. This study aimed to identify red rice plants resistant to the herbicides imazethapyr + imazapic at different stages of rice plant development, as well as, to develop a tool for identifying the resistance mechanism using SNAP ('single nucleotide amplified polymorphism') molecular markers. The bioassays used for seeds, seedlings and tillers discriminated resistant and susceptible individuals in a short evaluation period, being considered as a fast method for herbicide resistance diagnostic. The discriminatory concentrations between resistant and susceptible plants to the herbicides imazethapyr + imazapic for the bioassays of seeds, seedlings and tillers were 0,01 mM, 4 mM e 3 mM, respectively. The identification of the ALS gene nucleotide sequences in the resistant rice cultivars IRGA 422 CL, SATOR CL and PUITÁ INTA CL indicated that the mutations G<sub>654</sub>E, S<sub>653</sub>D and A<sub>122</sub>T, respectively, are responsible for the resistance. This information and the nucleotide sequence that surrounds these mutations were used for the development of the SNAP molecular markers to identify the possible mutations that confer the resistance in red rice. This analysis was varied out in a total of 481 plants from 38 populations collected during 2006/07 and 2007/08 seasons as escapes of control of the herbicides imazethapyr + imazapic. A phenotypic analysis in these plants indicated that the resistance level was high, medium and low in 12, 37 and 50 % for the populations of 2006/07 and in 32, 50 and 18 % for the populations of 2007/08, respectively. The molecular results indicated that the majority of these plants are resistant due the insensitivity of the ALS enzyme, caused by the same mutations found in the resistant rice cultivars. The prevention of the herbicide resistance in red rice must consider procedures related to the reduction of the selection pressure caused by the herbicide.

---

<sup>1</sup> Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (96p.) May, 2009.



## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A cultura do arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) irrigado.....	5
2.2 O arroz vermelho ( <i>Oryza sativa</i> L.).....	6
2.3 Herbicidas inibidores da enzima ALS.....	8
2.4 Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS.....	11
2.5 Resistência aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas.....	12
2.6 Cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas.....	13
2.7 Utilização de bioensaios para diagnóstico da resistência aos herbicidas.....	16
2.8 Utilização de marcadores do tipo SNP para diagnóstico da resistência aos herbicidas.....	19
2.9 Fluxo gênico.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Bioensaios para diagnóstico da resistência aos herbicidas.....	25
3.1.1 Bioensaio de embebição de sementes.....	28
3.1.2 Bioensaio de plântulas.....	29
3.1.3 Bioensaio de afilhos.....	30
3.2 Determinação das sequências do gene ALS em cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas.....	32
3.3 Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo 'single nucleotide amplified polymorphism' (SNAP).....	36
3.3.1 Determinação do mecanismo de resistência em indivíduos de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imidazolinonas através da utilização de marcadores SNAP.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Métodos de diagnóstico da resistência aos herbicidas em arroz.....	42
4.2 Determinação das sequências do gene ALS em cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas.....	54

	Página	
4.3	Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo ‘ <i>single nucleotide amplified polymorphism</i> ’ (SNAP) para identificação do mecanismo de resistência em arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas.....	68
4.3.1	Desenvolvimento dos marcadores SNAP.....	68
4.3.2	Identificação do mecanismo de resistência em arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas pelos marcadores SNAP.....	69
5	CONCLUSÕES.....	80
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
7	VITA.....	96

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Descrição das sequências nucleotídicas iniciadoras utilizadas na obtenção das sequências do gene ALS nas regiões que compreendem os domínios CAD e BE do gene.....	34
2. Descrição das sequências nucleotídicas iniciadoras utilizadas na obtenção das sequências do gene ALS na região F do gene ALS.....	34
3. Tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) gerados com as sequências nucleotídicas iniciadoras que amplificam a região F do gene ALS.....	35
4. Descrição das sequências dos marcadores do tipo ‘ <i>single nucleotide polymorphism</i> ’ (SNAP) utilizadas no diagnóstico de indivíduos resistentes aos herbicidas imidazolinonas.....	38
5. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) com relação ao comprimento do coleóptilo, expresso como porcentagem da testemunha não tratada, da cultivar de arroz irrigado resistente IRGA 422 CL e da cultivar suscetível IRGA 417, submetidas à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.....	45
6. Parâmetros $b^1$ , $d^2$ e $GR50^3$ da equação logística de três parâmetros e fator de resistência (FR) das cultivares de arroz, no bioensaio de sementes referente ao comprimento de raiz.....	45
7. Fatores de resistência (FR) estimados das cultivares de arroz irrigado resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic no bioensaio de sementes.....	47
8. Parâmetros $b^1$ , $d^2$ e $GR50^3$ da equação logística de três parâmetros e fator de resistência (FR) das cultivares de arroz, no bioensaio de plântulas referente ao comprimento de raiz.....	49
9. Fatores de resistência (FR) estimados das cultivares de arroz irrigado resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic no bioensaio de plântulas.....	50

	Página
10. Parâmetros $b^1$ , $d^2$ e $GR50^3$ da equação logística de três parâmetros e fator de resistência (FR) das cultivares de arroz, no bioensaio de afilhos referente ao comprimento de raiz.....	52
11. Fatores de resistência (FR) estimados das cultivares de arroz irrigado resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic no bioensaio de afilhos.....	52
12. Descrição das 16 populações de arroz vermelho, com 15 plantas por população, coletadas na safra 2006/07 em diferentes locais do estado do RS.....	71
13. Populações de arroz vermelho resistente, coletados em diferentes locais do estado do RS, provenientes da safra 2006/07 classificadas quanto ao nível de resistência aos herbicidas imazethapyr + imazapic e quanto à mutação encontrada utilizando os marcadores SNP422FW1, SNPSatFW1 e SNPPtaRev1.....	73
14. Descrição das 22 populações de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic coletadas na safra 2007/08 em diferentes locais do estado do RS.....	75
15. Populações de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic coletados em diferentes locais do estado de RS, provenientes da safra 2007/08 classificadas quanto ao nível de resistência e quanto à mutação encontrada utilizando os marcadores SNP422FW1, SNPSatFW1 e SNPPtaRev1.....	76

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Tanques de concreto utilizados para desenvolvimento das plantas de arroz cultivado.....	27
2. Representação da determinação do comprimento de raízes seminais obtidas a partir das sementes embebidas em diferentes concentrações dos herbicidas imazethapyr + imazapic. A seta em branco mostra a medição da raiz pelo programa IMAGE J.....	29
3. Esquema hipotético mostrando as regiões do gene ALS com 1935 pb e as principais sequências nucleotídicas iniciadoras que foram utilizados no presente trabalho para amplificação das regiões.....	33
4. Esquema mostrando o princípio de funcionamento da utilização da metodologia SNAP. A) Sequência do indivíduo resistente (destacando o local da mutação) e suscetível mostrando a direção de amplificação com utilização da sequência nucleotídica iniciadora em questão; B) Alinhamento das sequências, mostrando a base mutada (vermelho) e a base adicional <i>mismatch</i> (azul) no resistente, e o produto gerado pela reação de PCR com utilização do SNP422FW1 e C) Pareamento durante a reação e continuação da elongação na cultivar resistente e parada na elongação na suscetível.....	37
5. Esquema hipotético mostrando os polimorfismos gerados com a utilização dos marcadores SNAP, bem como a direção na amplificação durante a reação de PCR.....	38
6. Curvas dose-resposta com relação ao comprimento do coleóptilo, expresso como porcentagem da testemunha não tratada, da cultivar de arroz irrigado resistente IRGA 422 CL e da cultivar suscetível IRGA 417, submetidas à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.....	43
7. Curvas dose-resposta com relação à germinação de sementes, da cultivar de arroz irrigado resistente IRGA 422 CL e da cultivar suscetível IRGA 417, submetidas à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.....	44

	Página
8. Curvas dose-resposta do comprimento da raiz expressos em relação à porcentagem da testemunha não tratada, de cultivares de arroz irrigado submetidos à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.....	46
9. Curvas dose-resposta do comprimento da raiz expressos em relação à porcentagem da testemunha não tratada, de plântulas de cultivares de arroz irrigado, submetidas à solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.....	49
10. Curvas dose-resposta do comprimento da raiz, expresso em relação à porcentagem da testemunha não tratada, de afilhos de cultivares de arroz, submetidos a tratamento com solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.....	51
11. Amplificação do fragmento equivalente a 643pb para identificação da região CAD do gene ALS com as sequências iniciadoras Ar6F e Ar6R em cultivares de arroz. Colunas 1, marcador de peso molecular de 100pb; 2, PUITÁ INTA CL; 3, IRGA 422 CL e 4, IRGA 417 e 5, SATOR CL.....	54
12. Amplificação dos fragmentos equivalente a 441, 581 e 365 pb para identificação da região BE do gene ALS de cultivares de arroz. Colunas 1, marcador de peso molecular de 100pb; 2, sequências iniciadoras Ar1F e Ar1R; 3, sequências iniciadoras Ar2F e Ar2R e 4, sequências iniciadoras Ar5F e Ar5R.....	55
13. Amplificação dos fragmentos equivalente a 1038, 536 e 616 pb para identificação da região F do gene ALS de quatro cultivares de arroz. Colunas 1, marcador de peso molecular de 100pb; 2, sequências iniciadoras AnaF1a e AnaR2b; 3, sequências iniciadoras AnaF1a e AnaR1b e 4, sequências iniciadoras AnaF2b e AnaR2b....	56
14. Alinhamento da sequência obtida da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie <i>Oryza sativa</i> (AB049822). Em destaque sublinhado os domínios do gene e as mutações descritas na literatura por causarem a resistência aos herbicidas imidazolinonas. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.....	57
15. Alinhamento de todas as sequências obtidas da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie <i>Arabidopsis thaliana</i> (X51514). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.....	59
16. Alinhamento de todas as sequências obtidas da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie <i>Bromus tectorum</i> (AF488771). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.....	60

	Página
17. Alinhamento das sequências obtidas na região dos domínios CAD do gene ALS em cultivares de arroz com a sequência do gene ALS disponível no GenBank de <i>Arabidopsis thaliana</i> (X51514) e <i>Oryza sativa</i> L. (AB049822). Destaca-se em azul a mutação A <sub>122</sub> T, encontrada na cultivar PUITÁ INTA CL. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.....	64
18. Alinhamento das sequências obtidas na região do domínio BE do gene ALS de cultivares de arroz com a sequência do gene ALS disponível no GenBank de <i>Arabidopsis thaliana</i> (X51514) e <i>Oryza sativa</i> L. (AB049822). Destacam-se em azul as mutações encontradas nas cultivares IRGA 422 CL e SATOR CL. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.....	65
19. Alinhamento das sequências obtidas na região F do gene ALS de cultivares de arroz com a sequência do gene ALS disponível no GenBank de <i>Arabidopsis thaliana</i> (X51514) e <i>Oryza sativa</i> L. (AB049822). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.....	67
20. Teste da eficiência dos marcadores SNAPs no diagnóstico da mutação em cultivares de arroz. O gel agarose 2% mostra fragmentos de 133, 137 e 253 pb equivalentes aos SNP422FW1, SNPSatFW1 e SNPPtaRev1, respectivamente. Colunas: 1, marcador de peso molecular de 100bp; 2, IRGA 417; 3, IRGA 422 CL; 4, SATOR CL; 5, PUITÁ INTA CL e 6, Híbrido artificial de IRGA 417 e cultivar resistente para a qual o SNAP foi desenvolvido.....	69
21. Determinação do nível de resistência de diferentes populações de arroz vermelho aos 21 dias após a aplicação dos herbicidas imazethapyr + imazapic. A) Foto mostrando plantas aos 21 DAA e B) Esquema da disposição das plantas e o nível de resistência atribuído. BN: Baixo nível de resistência; MN: Médio nível de resistência e AN: Alto nível de resistência.....	70
22. Porcentagem das populações de arroz vermelho resistente aos herbicidas imazethapyr + imazapic, provenientes das safras 2006/07 e 2007/08, classificadas quanto ao nível de resistência como alto (AN), médio-alto (MA), médio (MN) e baixo (BN).....	72

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

Hg	nanograma
Pg	picograma
µL	microlitro
µL ml <sup>-1</sup>	microlitro por mililitro
µM	micromolar
°C	graus Celsius
A <sub>122</sub> T	alanina para treonina na posição 122
ACCase	enzima acetil coenzima-A carboxilase
Acetil-CoA	grupo Acetil coenzima-A
AHAS	aceto hidroxiácido sintase
Ala <sub>122</sub> /Ala <sub>205</sub>	alanina
ALS	aceto lactato sintase
AN	alto nível de resistência
Asp <sub>376</sub> /Asp <sub>653</sub>	ácido aspártico
AS-PCR	PCR alelo específico
ARMS	<i>amplification refractory mutation system</i>
BE	domínios B e E do gene ALS
BIOEDIT 7.0.9	<i>biological sequence alignment editor</i> – editor de sequências nucleotídicas
BLASTN 2.2.20	<i>basic alignment source tool</i> – ferramenta para alinhamento de sequências nucleotídicas
BN	baixo nível de resistência
C50	dose necessária do herbicida para causar 50 % de controle
CAD	domínios C, A e D do gene ALS
CL	<i>clearfield</i> – cultivares resistentes aos herbicidas imidazolinonas
CL 121/CL 141/CL 161	cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas
CLUSTALW	ferramenta para alinhamento de múltiplas sequências nucleotídicas
Cm	centímetro
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DAA	dias após a aplicação
dCAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequences</i> -marcador molecular
DHPLC	<i>denaturing high-performance liquid chromatography</i>
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
Drc	curvas dose-resposta
EMS	etil-metanosulfonato
EUA	Estados Unidos
F2	segunda geração de cruzamento
F	região do gene ALS entre os domínios CAD e BE
FAD	flavina adenina dinucleotídeo



FR	fator de resistência
G	grama
G <sub>2096S</sub>	glicina para serina na posição 2096
G <sub>654E</sub>	glicina para ácido glutâmico na posição 654
G <sub>654</sub>	glicina
g i.a. ha <sup>-1</sup>	gramas do ingrediente ativo por hectare
g i.a. L <sup>-1</sup>	gramas do ingrediente ativo por litro
G/C	guanina/citosina
GFX	coluna para purificação de DNA
Glu <sub>654</sub>	ácido glutâmico
GR50	dose do herbicida que causa 50 % de redução no crescimento
I50	dose do herbicida necessária para causar 50 % de inibição da atividade enzimática
IRGA 417	cultivar de arroz irrigado suscetível aos herbicidas imidazolinonas
IRGA 422 CL	cultivar de arroz irrigado resistente aos herbicidas imidazolinonas
ICMS	imposto para circulação de mercadorias e serviços
IMI	imidazolinonas
IMI crops	culturas resistentes a imidazolinonas
Kcal	quilocaloria
KDa	quilodalton
L	litro
Lb pol <sup>-2</sup>	libras por polegada ao quadrado
M	metro
m <sup>2</sup>	metro quadrado
M	molar
MI	mililitro
MG	miligrama
Mg <sup>2+</sup>	íon magnésio
Only <sup>®</sup>	herbicida formado pela mistura de imazethapyr + imazapic
Pb	pares de bases
PASA	PCR de alelo específico
PCR	reação da polimerase em cadeia
PCR-RFLP	PCR – <i>restriction fragment length polymorphism</i>
PIB	produto interno bruto
PRIMO PRO 3.4	programa de desenho de <i>primers</i>
Pro197	prolina
PROTOX	enzima protoporfirinogênio oxidase
PTB	pirimidiniltio-benzoatos
PUITÁ INTA CL	cultivar de arroz irrigado resistente aos herbicidas imidazolinonas
PWC16	cultivar de arroz irrigado resistente aos herbicidas imidazolinonas
R	resistente
RS	Rio Grande do Sul
S	suscetível
S <sub>653D</sub>	serina para ácido aspártico na posição 653
S <sub>653N</sub>	serina para asparagina na posição 653
S <sub>653</sub>	serina
SATOR CL	cultivar de arroz irrigado resistente aos herbicidas

	imidazolinonas
SCT	sulfonilaminocarboniltriazolinona
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleotídeo único
SNAP	<i>single nucleotide amplified polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleotídeo único com base adicional <i>mismatch</i>
SU	sulfoniluréia
t ha <sup>-1</sup>	toneladas por hectare
ThDP	tiamina difosfato
Thr122	treonina
Trp574	triptofano
TP	triazolopirimidinas
U\$	dólar
U	unidades de enzima
URL	<i>uniform resource locator</i>
V	volts
V <sub>669</sub> M	valina para metionina na posição 669
V9/V11	escala de desenvolvimento do arroz referente ao período de perfilhamento

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. O Brasil destaca-se por ser o único país não asiático entre os dez maiores produtores de arroz, sendo responsável por 2 % da produção mundial (FAO, 2009). O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz no Brasil, produzindo na safra 2007/08 o equivalente a 7,4 milhões de toneladas (CONAB, 2008). O arroz gaúcho representa aproximadamente 61 % da produção nacional e é o grande responsável por manter o abastecimento com preços acessíveis à população. Apesar do significativo progresso no rendimento de grãos no estado desde a safra 2002/03, o desempenho de 7 t ha<sup>-1</sup> (IRGA, 2008), obtido na safra 2007/08, está aquém do alcançado pelas lavouras que adotam alto nível tecnológico e de áreas experimentais. Este fato deve-se ao manejo inadequado da cultura no que se refere ao uso de sementes não certificadas, a falta de rotação de culturas e principalmente ao controle insatisfatório das plantas daninhas. Entre as espécies daninhas que infestam as lavouras do estado, destaca-se o arroz vermelho como aquela que mais limita o potencial de produtividade do arroz, estando presente na quase totalidade das regiões cultivadas com arroz irrigado.

O arroz vermelho constitui-se de biótipos silvestres da espécie *Oryza sativa* (L.). A denominação “arroz vermelho” deve-se à coloração avermelhada do pericarpo dos grãos e é dito daninho por apresentar elevada debulha natural, dormência de sementes, potencial competitivo, afilhamento e maior porte de planta. A elevada debulha é uma das

características mais importantes, pois limita a possibilidade de eliminação dos grãos de arroz pela colheita, resultando em reposição contínua do banco de sementes do solo. A ocorrência desta planta daninha nas lavouras de arroz reduz a produtividade e qualidade do produto final. Por pertencer à mesma espécie que o arroz cultivado, o arroz vermelho não pode ser controlado por herbicidas em situações de utilização de cultivares convencionais, não transgênicas ou não selecionadas para tolerância a herbicidas. Como alternativa de controle químico do arroz vermelho, foi desenvolvido a linhagem 93AS3510 constituindo-se de plantas de arroz tolerantes aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas através de mutação induzida por radiação gama e/ou transformação química por etil-metanossulfonato (EMS), seguida de seleção de genótipos tolerantes aos herbicidas (Croughan, 1998). Esta tecnologia permitiu o controle do arroz vermelho pela utilização de herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas. Este grupo químico atua inibindo a atividade da enzima acetolactato sintase (ALS).

Os herbicidas inibidores da enzima ALS estão distribuídos em cinco grupos químicos: sulfoniluréias, imidazolinonas, triazolpirimidinas, pirimidiniltio-benzoatos e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas. A enzima ALS atua na rota bioquímica de síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. A resistência de plantas a estes herbicidas pode surgir devido à ocorrência de mutação no gene ALS resultando em insensibilidade do local de ação, metabolização do herbicida, ou devido à limitação de absorção e translocação do herbicida.

Atualmente, a área cultivada com arroz na safra 2007/08 no RS perfaz o equivalente a um milhão de hectares e, mais da metade desta área é cultivada com cultivares tolerantes aos herbicidas imidazolinonas (IRGA, 2008). O manejo inadequado da cultura no que se refere ao uso de sementes não certificadas, a não utilização de rotação de cultura, o uso contínuo de um mesmo herbicida, somado à atual inexistência de possibilidade de rotação de mecanismos de ação de herbicidas destinados ao controle de

arroz vermelho, gerou grande pressão de seleção sobre esta planta daninha. Em estudo de monitoramento da ocorrência de arroz vermelho resistente aos herbicidas do grupo das imidazolinonas realizadas em 228 lavouras do estado do RS constatou-se que, 127 delas (55,7 %) apresentaram indivíduos resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic (Menezes *et al.*, 2008), indicando a grande frequência deste problema mesmo com poucos anos de utilização deste método de controle.

O surgimento de biótipos de arroz vermelho resistentes pode resultar da ocorrência de fluxo gênico entre o arroz cultivado resistente a imidazolinonas ou de um processo de evolução onde os indivíduos resistentes foram selecionados independentemente da presença do herbicida. Existe a necessidade de desenvolvimento de técnicas para diagnóstico rápido da resistência aos herbicidas em biótipos de arroz vermelho para identificação de indivíduos resistentes em diferentes estádios do ciclo de desenvolvimento do arroz. A rápida identificação de indivíduos resistentes é fundamental para estabelecimento de medidas de controles com agilidade e maior eficiência. O estudo das mutações envolvidas com a resistência pode permitir o desenvolvimento de um método molecular para identificação do mecanismo de tolerância em arroz vermelho. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas para rápido diagnóstico da resistência em conjunto com a identificação do mecanismo podem proporcionar melhor monitoramento de lavouras de arroz e o desenvolvimento de estratégias de sustentabilidade do controle de arroz vermelho.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos expeditos para a identificação de plantas de arroz resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic e de métodos moleculares para identificação do mecanismo de resistência a estes herbicidas com vistas a proporcionar monitoramento de lavouras de arroz e o desenvolvimento de estratégias de sustentabilidade do controle de arroz vermelho.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Desenvolver métodos de avaliação da resistência aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase em arroz através de bioensaios que permitam o diagnóstico da resistência nas fases de desenvolvimento de sementes, plântulas e afilhos;
- ii) Identificar a sequência nucleotídica do gene acetolactato sintase presente nas principais cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas, utilizadas no estado do Rio Grande do Sul, com vistas ao desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo '*single nucleotide amplified polymorphism*';
- iii) Diagnosticar o mecanismo de resistência aos herbicidas em populações de arroz vermelho coletadas como escapes de controle à utilização dos herbicidas imazethapyr + imazapic pelas análises moleculares com os marcadores '*single nucleotide amplified polymorphism*'.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado

O arroz cultivado pertence à família Poaceae e é considerado como modelo genético no estudo de liliopsidas (Izawa & Shimamoto, 1996), porque apresenta um genoma pequeno (2.02 pg) (Bennett & Leitch, 1997). É uma espécie autógama e diplóide ( $2n=24$ ), com genoma “AA” do grupo *Oryza* (Gealy *et al.*, 2002). Plantas da espécie *Oryza sativa*, como por exemplo, o arroz cultivado e o próprio arroz vermelho, podem cruzar entre si e com outras espécies do grupo AA (Sitch, 1990; Singh & Khush, 2000).

O arroz é considerado o cereal mais importante para consumo humano por ser uma fonte básica de nutrientes na alimentação de mais da metade da população mundial. Este alimento é uma excelente fonte de energia devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, e possui baixo teor de lipídios. Nos países em desenvolvimento, onde o arroz é um dos principais alimentos, este é responsável por fornecer, em média, 715 kcal per capita por dia, 27 % dos carboidratos, 20 % das proteínas e 3 % dos lipídios da alimentação (Walter *et al.*, 2008). No Brasil, o consumo per capita é de 108 g por dia, fornecendo 14 % dos carboidratos, 10 % das proteínas e 0,8 % dos lipídios da dieta (Keneddy *et al.*, 2002).

A produção mundial anual de arroz é de, aproximadamente, 672 milhões de toneladas (FAO, 2009). O Brasil é auto-suficiente em relação à produção de arroz, produzindo na safra 2007/08 aproximadamente 12 milhões de toneladas, sendo 61 % desta produção obtida no estado do Rio Grande do Sul (RS), o qual foi responsável por produzir

o equivalente a 7,4 milhões de toneladas (CONAB, 2008). O rendimento médio de grãos do estado está próximo do alcançado em países tradicionais no cultivo de arroz irrigado, estando pouco abaixo das médias obtidas nos Estados Unidos, Egito, Austrália, Marrocos, Uruguai e Peru. Na safra 2007/08, o estado alcançou produtividade média de 7 t ha<sup>-1</sup> (IRGA, 2008).

No RS, o arroz é cultivado em um milhão de hectares e representa 10 % do PIB (Produto Interno Bruto) do agronegócio, gerando R\$ 175 milhões em ICMS (Imposto para Circulação de Mercadorias e Serviços) e 250 mil empregos no estado (EMBRAPA, 2008). Apesar de possuir elevados potenciais de rendimentos de grãos, diversos fatores como manejo inapropriado da cultura, uso de sementes não certificadas e principalmente, controle insatisfatório de plantas daninhas, limitam o incremento da produtividade e a manutenção da sustentabilidade do cultivo do arroz. Dentre estes fatores, a elevada incidência de arroz vermelho destaca-se como fator mais limitante no potencial produtivo do arroz na maioria das regiões do mundo, principalmente, no Brasil (Webster, 2000; Noldin *et al.*, 2004).

## **2.2 O arroz vermelho (*Oryza sativa* L.)**

O arroz vermelho, também conhecido como arroz daninho, é originário da Ásia e é considerada a mais importante planta infestante da lavoura orizícola do RS (Noldin *et al.*, 2004), em razão das perdas econômicas causadas pela diminuição da produção de arroz. Essas perdas referem-se principalmente à diminuição do rendimento de grãos e da qualidade dos grãos colhidos, elevando os custos de produção devido à necessidade de controle e aos problemas operacionais na colheita, secagem e beneficiamento.

No Sul do Brasil, os prejuízos relacionados à competição com arroz vermelho são estimados em 20 % do rendimento de grãos. Aproximadamente 1,3 milhões de toneladas



de arroz são perdidas devido à competição com arroz vermelho no RS, representando um prejuízo anual equivalente à aproximadamente 360 milhões de dólares (IRGA, 2008).

Na região orizícola do sul dos Estados Unidos, o arroz vermelho também se caracteriza por ser o principal problema em relação à competição com as cultivares de arroz (Gealy *et al.*, 2002; Norsworthy *et al.*, 2007). Os prejuízos causados aos produtores do estado do Arkansas, EUA, devido à competição com o arroz vermelho no ano de 2006 foram de aproximadamente U\$ 300,00 por hectare (Burgos *et al.*, 2008).

O arroz vermelho corresponde a diversos biótipos silvestres da própria espécie *Oryza sativa* L. e a biótipos de *O. nivara* e *O. rufipogon* (Vaughan *et al.*, 2001). Esta planta daninha caracteriza-se por serem plantas de maior estatura, com folhas decumbentes, pelo vigor e alta capacidade de afilamento com emissão de afilhos ontogenicamente atrasados, pericarpo de cor avermelhada, pálea e lema com variação na cor, pilosidade e aderência da pálea e lema ao pericarpo, presença ou não de arista e sementes com dormência (Diarra *et al.*, 1985; Noldin *et al.*, 1999).

É considerada planta daninha principalmente pelos danos diretos no rendimento de grãos. Ainda, o arroz vermelho apresenta elevada debulha natural, desta forma, se estabelece com a cultura, compete com esta, mas tem a colheita de seus grãos impossibilitada devido à debulha precoce de seus grãos. O número de afilhos, a estatura e a massa seca da parte aérea das plantas de cultivares de arroz são afetados negativamente devido à competição com arroz vermelho (Fleck *et al.*, 2008), demonstrando a habilidade competitiva superior desta planta daninha. Biótipos de arroz vermelho procedentes de lavouras de arroz irrigado do RS e SC apresentaram alta variabilidade quanto às características de sementes e à intensidade da duração da dormência (Schwanke *et al.*, 2008) podendo alguns biótipos apresentaram sementes com período de dormência de até 150 dias após a colheita.

Devido ao fato do arroz cultivado e do arroz vermelho pertencerem à mesma espécie, o controle desta planta daninha com uso de herbicidas seletivos torna-se difícil. As práticas recomendadas para manejo do arroz vermelho estão relacionadas à combinação de ações integradas, como: emprego de sementes isentas de arroz vermelho, uso da rotação de culturas, manejo adequado da água de irrigação, semeadura direta da cultura, semeadura direta após cultivo mínimo, sistema pré-germinado de semeadura e transplante de mudas, uso de regulador de crescimento, prática de pousio na área, manejo da área na entressafra, uso de marrecos-de-pequim e aplicação localizada de herbicidas no momento do florescimento (Fischer & Ramirez, 1993; SOSBAI, 2007). No entanto, estas medidas possuem limitada eficiência ou impossibilidade de execução em áreas extensas, e assim, a infestação de arroz vermelho tem continuamente se intensificado nas lavouras de arroz do RS e de todo o mundo.

A introdução de uma cultivar de arroz resistente ao herbicida imazethapyr no ano de 2000 (Croughan *et al.*, 1996) permitiu o controle químico seletivo do arroz vermelho nessa cultura. Este herbicida pertence ao grupo químico das imidazolinonas e causa a morte das plantas por inibição da enzima acetolactato sintase (ALS). A utilização de cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas representa um importante método de controle de arroz vermelho e tem sido extensivamente utilizada em várias regiões do mundo.

### **2.3 Herbicidas inibidores da enzima ALS**

Acetolactato sintase (ALS; EC 4.1.3.18; AHAS, acetohidroxiácido sintase) catalisa o primeiro passo na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina (Mazur *et al.*, 1987). Plantas e microorganismos conseguem sintetizar os esqueletos de carbonos destes aminoácidos a partir de piruvato (valina), piruvato mais acetil-CoA (leucina) ou piruvato mais 2-cetobutirato (isoleucina) (Duggleby *et al.*, 2008).

A ausência destes aminoácidos ocasiona retardo ou inibição do crescimento poucas horas após a aplicação foliar destes herbicidas. Dois a quatro dias após a aplicação, o meristema apical torna-se clorótico com posterior necrose. As folhas jovens murcham, as nervuras desenvolvem pigmentos antociânicos, havendo frequente necrose da nervura e abscisão de folhas. Em algumas plantas ocorre o encurtamento dos entrenós e o espessamento da base do caule. As raízes secundárias desenvolvem-se pouco e apresentam tamanho uniforme entre si. A morte das plantas pode demorar de dez dias até dois meses, dependendo da velocidade de desenvolvimento das plantas (Vidal & Merotto, 2001).

Na literatura mais antiga, AHAS é sempre mencionada como acetolactato sintase (ALS), porém bioquimicamente este nome não é o mais adequado porque ele ignora a função da enzima em sintetizar 2-aceto-2-hidroxitirato (Duggleby *et al.*, 2008). O nome ALS é correto para a enzima que sintetizar apenas 2-acetolactato, como aquela encontrada em *Klebsiella pneumoniae* (Pang *et al.*, 2004). Porém, na ciência das plantas daninhas o mecanismo de ação permanece com a nomenclatura de herbicidas inibidores da ALS.

O uso dos herbicidas inibidores da ALS aumentou intensamente desde a sua introdução nos anos 80. Em 1994, o número de herbicidas liberados no mercado já era de 30 (Saari *et al.*, 1994) e, hoje são conhecidas 51 moléculas comerciais destes herbicidas (Heap, 2009). A rápida adoção destes produtos justifica-se pelo fato de controlarem um amplo espectro de plantas daninhas, de serem utilizados em baixas concentrações, por serem seletivos a várias culturas e por apresentarem baixa toxicidade ao homem e ao ambiente (McCourt *et al.*, 2006). O perfil toxicológico favorável dos herbicidas inibidores da ALS explica-se pelo fato de atuarem em uma enzima ausente em mamíferos (Mazur & Falco, 1989). Os aminoácidos sintetizados pela enzima ALS são obtidos de plantas ou bactérias, por isso herbicidas inibidores da ALS tendem a ter menor impacto nos animais do que herbicidas com outros modos de ação (Reade & Cobb, 2002; Tan *et al.*, 2006). Por serem utilizados em baixas concentrações, os herbicidas inibidores

de ALS são os grandes responsáveis pelo declínio na quantidade total de herbicidas aplicados nos sistemas agrícolas (Fletcher *et al.*, 1993; Bellinder *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2004).

Herbicidas inibidores de ALS compreendem cinco classes químicas que incluem: sulfoniluréias (SU) (Chaleff & Mauvais, 1984), imidazolinonas (IMI) (Shaner *et al.*, 1984), pirimidiniltio-benzoatos (PTB) (Stidham, 1991), triazolpirimidinas (TP) (Gerwick *et al.*, 1990) e sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (SCT) (Santel *et al.*, 1999).

A enzima ALS é composta por dois tipos de subunidades. Uma delas, chamada de subunidade maior, é a que possui atividade catalítica e apresenta massa molecular de 59-66 KDa em eucariotos (Duggleby *et al.*, 2008). A segunda subunidade possui atividade regulatória e seu tamanho varia entre os organismos, na faixa de 10 a 20 KDa em bactérias, 34 KDa em leveduras e 50 KDa em plantas (Duggleby *et al.*, 2008). Recentemente, a estrutura cristalográfica da subunidade catalítica de AHAS de *Arabidopsis thaliana* foi determinada em complexo com os herbicidas clorimuron-etil (SU) e imazaquin (IMI) (McCourt *et al.*, 2006). A subunidade catalítica da enzima AHAS de *A. thaliana* na presença de um herbicida ou de cofatores (ThDP,  $Mg^{2+}$ , FAD) cristaliza e adquire a forma de um tetrâmero. Já em solução sem a presença de cofatores ou herbicida esta subunidade está na forma de dímeros. Cada polipeptídeo da subunidade catalítica da AHAS consiste de três domínios:  $\alpha$  (86-280 resíduos),  $\beta$  (281-451 resíduos) e  $\gamma$  (463-639 resíduos) (Duggleby *et al.*, 2008).

O estudo da estrutura cristalográfica da enzima levou ao melhor entendimento de um dos mecanismos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS, o mecanismo de local de ação alterado. Este se caracteriza por ser o mais comumente citado na literatura como causa da resistência aos herbicidas em plantas. A intensidade da seleção para resistência aos herbicidas em plantas daninhas está relacionada à dose do herbicida utilizada, à intensidade do uso, a persistência do mesmo no ambiente e a sua especificidade.

Herbicidas com alto poder residual, ou seja, que permanecem maior tempo no ambiente, exercem maior pressão de seleção e os inibidores da ALS enquadram-se nesse perfil liderando o número de casos de plantas daninhas resistentes mundialmente (Heap, 2009).

As primeiras plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS foram: *Lactuca serriola* L., reconhecida em 1987 (Mallory-Smith *et al.*, 1990) e *Kochia scoparia* L. também reconhecida no ano de 1987 (Primiani *et al.*, 1990). Desde então, 101 espécies, incluindo liliopsidas e magnoliopsidas, foram identificadas como resistentes a uma ou mais classes de herbicidas inibidores da ALS (Heap, 2009). A alta frequência de surgimento de plantas daninhas resistentes caracteriza-se como uma desvantagem dos herbicidas inibidores da ALS em relação a herbicidas de outros mecanismos de ação.

#### **2.4 Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS**

A evolução da resistência aos herbicidas em plantas pode ocorrer devida a mutações no gene alvo do herbicida que resulta em maior insensibilidade a este, em aumento ou super expressão da enzima alvo, em metabolização destes compostos, em absorção reduzida do produto, em redução da quantidade do herbicida que atinge o local de ação na planta-alvo por translocação reduzida ou em seu sequestro e compartimentalização (Powles & Shaner, 2001). Na maioria dos casos, a resistência aos inibidores da ALS resulta de uma mutação do gene ALS com redução da sensibilidade a estes herbicidas (Saari *et al.*, 1994). Aumento nas taxas de metabolismo também tem sido reportado (Christopher *et al.*, 1992a; Christopher *et al.*, 1992b; Veldhuis *et al.*, 2000). Alterações na enzima ALS ocorrem por substituições de aminoácidos em múltiplos locais no gene ALS (Shaner, 1999). No total, 17 substituições diferentes de aminoácidos (6 naturais e 11 artificiais) que conferem resistência aos herbicidas, foram identificadas em plantas, leveduras, bactérias e algas verdes (Zhou *et al.*, 2007). Estas substituições encontram-se

nas seguintes posições, com base na sequência do gene ALS de arábida: 121, 122, 124, 196, 197, 199, 205, 206, 256, 351, 352, 376, 570, 571, 574, 578 e 653 (Duggleby *et al.*, 2000; Tranel & Wright, 2002; Michael *et al.*, 2006). Entretanto, apenas seis destes pontos de mutação, alanina 122 (Ala<sub>122</sub>), prolina 197 (Pro<sub>197</sub>), alanina 205 (Ala<sub>205</sub>), asparagina 376 (Asp<sub>376</sub>), triptofano 574 (Trp<sub>574</sub>) e serina 653 (Ser<sub>653</sub>) foram confirmados como mutações que resultam na resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos de plantas daninhas, em situações naturais de cultivo a campo (Tranel & Wright, 2002; Whaley *et al.*, 2007).

## 2.5 Resistência aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas

A maior parte das mutações que conferem tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas surge da substituição de aminoácidos nos domínios  $\alpha$  e  $\gamma$ , sendo que muitos pesquisadores referem-se a essas duas regiões como domínios A e B no gene ALS (Wright *et al.*, 1998). A mutação em Ser<sub>653</sub> é a responsável por conferir tolerância ao grupo das imidazolinonas, mas não confere resistência cruzada aos outros grupos inibidores da ALS (Lee *et al.*, 1999; Tranel & Wright, 2002), destacando-se como uma característica preferível para desenvolvimento de cultivares resistentes aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas ('IMI crops'). A exceção é a planta daninha *Amaranthus hybridus* que possui a mutação S<sub>653</sub>N e apresenta resistência cruzada aos quatro grupos dos herbicidas inibidores da ALS (SU, IMI, TP, PTB) (Whaley *et al.*, 2006). A mutação em Trp<sub>574</sub> geralmente confere tolerância cruzada a quatro grupos de inibidores da ALS e vem sendo utilizada para desenvolvimento de culturas tolerantes a imidazolinonas (Tranel & Wright, 2002). Da mesma forma, mutações em Ala<sub>122</sub> e Ala<sub>205</sub> exibem tolerância aceitável a imidazolinonas (Tranel & Wright, 2002). Em contrapartida, a mutação em Pro<sub>197</sub> não confere ou confere pouca tolerância a imidazolinonas, mas é utilizada para desenvolvimento de tolerância a sulfoniluréias

(Tranel & Wright, 2002; Yu *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2006). A maioria das culturas tolerantes a imidazolinonas comercializadas é desenvolvida da combinação a partir das mutações Ala<sub>205</sub>, Trp<sub>574</sub> e Ser<sub>653</sub> (Bruniard *et al.*, 2001).

A análise da base molecular da resistência pelo estudo da estrutura cristalográfica da enzima sugere que os herbicidas dos grupos das sulfoniluréias e imidazolinonas ligam-se à enzima em um canal e impedem a ligação dos cofatores à enzima (Pang *et al.*, 2002, 2003; Duggleby *et al.*, 2003). Assim, ocorre a inibição da atividade enzimática e a planta é dita suscetível. Porém, uma alteração em um dos aminoácidos que ancoram a ligação enzima/herbicida de forma que a molécula herbicida não consiga se ligar a enzima resulta em resistência a este composto, sendo que a atividade enzimática não é ou é pouco afetada, pois o canal não está bloqueado permitindo a ligação dos cofatores.

As culturas que apresentam tolerância aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas têm sido desenvolvidas por meio de seleção ou mutagênese, seguida de seleção. A transferência da tolerância para outras cultivares é realizada utilizando técnicas convencionais de cruzamento de plantas (Newhouse *et al.*, 1991; Shaner *et al.*, 1996).

## **2.6 Cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas**

O desenvolvimento de cultivares de arroz resistente a imidazolinonas ocorreu a partir de sementes de arroz da linhagem AS3510 que foram mutagenizadas com etil-metanossulfonato (EMS) (Croughan, 1998). As plantas oriundas destas sementes foram pulverizadas com o herbicida imazethapyr, sendo que apenas uma pequena porcentagem destas sobreviveram, com a progênie deste arroz mostrando-se tolerante aos herbicidas inibidores da ALS (Croughan, 1998). Esta linhagem de mutantes foi referida como 93AS3510 e a partir desta, duas variedades de arroz tolerantes a imidazolinonas, CL 121 e CL 141, foram desenvolvidas e se tornaram no ano de 2001 as primeiras 'IMI crops' comercializadas nos EUA (Webster *et al.*, 2001; Gealy *et al.*, 2003).

Técnica similar de mutagênese foi empregada sobre a cultivar de arroz Cypress, originando a linhagem PWC16, que foi utilizada para desenvolvimento da cultivar CL 161, comercializada pela primeira vez, nos EUA no ano de 2003 (Tan *et al.*, 2005). Na Argentina, a cultivar PUITÁ INTA CL foi obtida por mutagênese e seleção das linhas resistentes a imidazolinonas (Livore *et al.*, 2003).

A mutação responsável pela resistência na linhagem 93AS3510 é Gly<sub>654</sub> para Glu<sub>654</sub>, também representada por G<sub>654</sub>E (Tan *et al.*, 2005) e, na linhagem PWC16, corresponde à mutação Ser<sub>653</sub> para Asp<sub>653</sub> (S<sub>653</sub>D) (Rajguru *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005). Já a mutação que confere resistência a cultivar PUITÁ INTA CL, é Ala<sub>122</sub> para Thr<sub>122</sub> (A<sub>122</sub>T) (Livore *et al.*, 2003).

No Brasil, a cultivar de arroz resistente a herbicidas imidazolinonas IRGA 422 CL foi desenvolvida pela seleção de retrocruzamento, utilizando-se a linhagem 93AS3510 como fonte doadora do gene que confere tolerância ao herbicida e a cultivar IRGA 417 como cultivar recorrente (Lopes *et al.*, 2002). Foram realizadas cinco gerações de retrocruzamento, ensaios de rendimento de grãos e avaliações para características fenotípicas. A linhagem selecionada deu origem a cultivar IRGA 422 CL que se distingue da cultivar original IRGA 417 por possuir o gene que confere tolerância aos herbicidas imazethapyr + imazapic e, ainda, por apresentar ciclo médio (121 a 135 dias), pubescência do limbo média, cor da folha verde clara e peso 1000 grãos de 29,3 g (Lopes *et al.*, 2002). A cultivar IRGA 422 CL é recomendada exclusivamente para o sistema de produção Clearfield™, que tem como principal objetivo o controle do arroz vermelho (SOSBAI, 2007).

A cultivar IRGA 417 foi a primeira cultivar do tipo moderno derivada de cruzamentos de genitores das subespécies índica x japônica, destacando-se pela precocidade (ciclo de 115 dias), alta produtividade, ótima qualidade de grãos, alto vigor inicial de plântulas e boa adaptabilidade a todas as regiões orízicolas do estado do RS



(SOSBAI, 2007). Ainda, esta cultivar possui folhas curtas eretas e pilosas, e peso de 1000 grãos de 27,6 g (IRGA, 2009). A cultivar SATOR CL é um híbrido de arroz que apresenta alta resistência aos herbicidas imazethapyr + imazapic, ciclo médio (121 a 135 dias), com boa adaptabilidade a zonas temperadas, subtropicais e tropicais. Apresenta alto potencial produtivo, sendo que na safra 2006/07 alcançou produtividade média de 15 t ha<sup>-1</sup> no município de Jaguarão/RS (SOSBAI, 2007). A cultivar PUITA CL foi recentemente introduzida da Argentina, e ainda não se dispõe na literatura das informações agronômicas desta cultivar.

Salienta-se o aumento do rendimento de grãos da cultura do arroz pelo controle de arroz vermelho com herbicidas seletivos. A maximização dos níveis de produtividade de arroz pode ser alcançada pela estratégia de utilização das cultivares de arroz resistente aos herbicidas (Villa *et al.*, 2006), representando um benefício direto para os agricultores pelo aumento nos lucros e até mesmo para as regiões produtoras que terão incrementos na geração de renda e na arrecadação de impostos. No entanto, apesar de representar um grande benefício para a cultura do arroz, a utilização de cultivares resistentes aos herbicidas imidazolinonas pode apresentar limitações, principalmente relacionadas ao surgimento de arroz vermelho resistente aos herbicidas. Embora o controle de arroz vermelho pelo uso desses herbicidas seja eficiente, geralmente não chega a 100 % de eficiência em situações de lavoura. Isso pode ocasionar em longo prazo, problemas ao sistema, pois, por menor que seja a porcentagem de arroz vermelho não controlado este pode cruzar com o arroz cultivado (Villa *et al.*, 2006).

Apesar do arroz ser uma espécie de hábito reprodutivo preferencialmente autógamo, com uma taxa de fecundação cruzada, em geral, inferior a 1 % (Roberts *et al.*, 1961; Gealy *et al.*, 2003), existe a possibilidade de ocorrer fecundação cruzada. Nas condições edafoclimáticas do Rio Grande do Sul, a análise de mais de 250 mil sementes de arroz vermelho indicou que a taxa de cruzamento foi baixa, variando

de 0,1 a 0,04 % (Magalhães Jr *et al.*, 2001). De acordo com estes autores, a taxa de cruzamento é dependente da coincidência da floração entre os genótipos e da ocorrência de estresses, sendo que a probabilidade de ocorrência de cruzamento é maior a curta distância, não existindo em distâncias superiores a cinco metros.

O surgimento de arroz vermelho resistente pode ocorrer por evolução natural ou por fluxo gênico. Kuk *et al.* (2008) verificaram 130 acessos de arroz vermelho provenientes de 26 lavouras no estado do Arkansas, EUA, em relação à tolerância ao herbicida imazethapyr. Concluiu-se neste trabalho que esta característica devia-se a outro mecanismo de resistência que não o local de ação insensível da enzima. Neste caso, a tolerância não foi originária de fluxo gênico, mas de um processo de evolução natural em função da pressão de seleção gerada pelo sistema. A elevada frequência de surgimento de plantas de arroz vermelho resistente aos herbicidas indica a necessidade do desenvolvimento de métodos expeditos para proporcionar a correta e a rápida identificação de indivíduos resistentes.

## **2.7 Utilização de bioensaios para diagnóstico de resistência aos herbicidas**

O diagnóstico de plantas daninhas resistentes em uma lavoura é essencial para nortear modificações no seu manejo. Este diagnóstico deve ser inequívoco e rápido permitindo maior agilidade e maior eficiência das medidas a serem implantadas. O primeiro passo na caracterização do biótipo resistente (R) requer uma detalhada curva de dose-resposta em que as doses utilizadas variam de 10 a 1000 vezes da dose que seria letal ao biótipo suscetível (S) e a resposta da planta ao herbicida é baseada em análise visual, mortalidade, inibição do crescimento em relação à testemunha não tratada (Beckie *et al.*, 2000). A resistência é confirmada quando a curva dose-resposta dos biótipos é estatisticamente diferente e o biótipo R não é mais controlado com as doses que controlam o biótipo S (Beckie *et al.*, 2000).

Ensaio realizados em casa-de-vegetação de curva dose-resposta correspondem a experimentos clássicos para identificar ou confirmar casos de resistência. Nestes ensaios, sementes dos biótipos sob suspeita são coletadas, semeadas e quando as plantas alcançam à fase de desenvolvimento adequada à aplicação do herbicida (em geral de duas a quatro folhas completamente expandidas) é realizada a aspersão dos herbicidas nas diversas doses e os resultados são comparados com biótipos sabidamente suscetíveis (Gazziero *et al.*, 1998; Vidal & Trezzi, 1999; Gazziero *et al.*, 2000).

Os experimentos clássicos de identificação da resistência acima demandam muito tempo e espaço para sua execução sendo onerosos e não expeditos e, desta forma, não são adequados para análise de um grande número de amostras. Além disso, o tempo muito longo entre o aparecimento da suspeita e a confirmação da resistência, atrasam a tomada de decisão em relação ao manejo da lavoura. Assim sendo, abordagens mais expeditas são necessárias para identificação de biótipos resistentes. Desta forma, bioensaios de embebição de sementes, ensaios com as partes aéreas da própria planta sob suspeita e ensaios com a enzima-alvo, entre outros, podem ser utilizados para identificação de plantas resistentes aos herbicidas (Beckie *et al.*, 1990; Beckie *et al.*, 2000).

O método desenvolvido por Boutsalis (2001), que consiste em coletar plantas suspeitas de resistência, desfolhá-las, podar drasticamente as raízes e enviá-las ao local onde serão analisadas, as plantas para são transplantadas para vasos, e após um período de aclimação e desenvolvimento de novas raízes e folhas de aproximadamente 20 dias, aplicam-se os herbicidas de interesse e aguarda-se um período de cerca de 15 dias para confirmação da resistência. A grande vantagem desse método é que a confirmação da resistência pode ser realizada já na própria estação de crescimento em que se identificaram as plantas suspeitas.

Experimentos desenvolvidos com plântulas das espécies *Eleusine indica* resistentes a inibidores da ACCase e *Euphorbia heterophylla* e *Bidens subalternans* resistentes a

inibidores da ALS requereram o período de apenas quatro dias para identificar a resistência (Portes, 2005). Em bioensaios de germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla*, com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX, onde as sementes foram depositadas em placas de petri contendo diferentes concentrações dos herbicidas imazethapyr e fomesafen, foi possível discriminar os biótipos R e S em um período de apenas 144 horas (Trezzi *et al.*, 2006). Ainda, diversos outros trabalhos utilizando bioensaios de embebição de sementes vêm sendo conduzidos, tendo mostrado resultados satisfatórios na discriminação da resistência (Beckie *et al.*, 1990; Beckie *et al.*, 2000; Burke *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2000; Tal *et al.*, 2000; Escorial *et al.*, 2001; Kuk *et al.*, 2003; Perez & Kogan, 2003).

Os resultados das avaliações de curva dose-resposta destes testes são frequentemente baseados em ajustes de modelos de regressão não linear, como os descritos por Streibig *et al.* (1993) e Brain & Cousens (1989). Dois modelos para curvas de dose-resposta sigmoidais são amplamente utilizados, o modelo logístico e o modelo de Gompertz (Ritz & Streibig, 2005). Destes, o modelo log-logístico, no qual se utilizam parâmetros que são biologicamente significativos quando aplicados à resposta da planta ao herbicida, é o mais apropriado na análise da maioria dos estudos de dose-resposta (Seefeldt *et al.*, 1998). O modelo logístico de quatro parâmetros é dado pela fórmula:

$$f(x, (b, c, d, e)) = c + \frac{d - c}{1 + \exp\{b(\log(x) - \log(e))\}}$$

em que  $f(x)$  representa a variável dependente a ser estimada,  $d$  representa o limite superior da curva,  $c$  representa o limite inferior,  $b$  é a inclinação da curva no ponto em que esta produz a metade da resposta entre os valores inferior e superior e o parâmetro  $e$ , também conhecido como GR50, é a dose em que é produzida metade da resposta entre os limites inferior e superior (Ritz & Streibig, 2005).

Por estes modelos é possível encontrar a dose responsável por controlar 50 % dos biótipos (C50) ou a dose que reduz 50 % da massa seca de plantas (GR50), ou ainda, a redução da atividade enzimática (I50) em 50 % (Lamego, 2008). O fator de resistência (FR) é obtido pela relação do C50, GR50 ou I50 entre o genótipo resistente e o suscetível, expressando quantas vezes que o genótipo R é mais resistente que o S (Hall *et al.*, 1998).

## **2.8 Utilização de marcadores do tipo SNP para diagnóstico da resistência aos herbicidas**

Com o advento da biologia molecular, o diagnóstico da resistência pode ser realizado pelas técnicas moleculares a partir do DNA quando a mutação que gerou a resistência é conhecida (Délye *et al.*, 2002a; Corbett & Tardif, 2006). Diversas técnicas que diferem em complexidade, equipamentos requeridos e reprodutibilidade nos resultados têm sido desenvolvidas, como por exemplo, PCR-RFLP (*'restriction fragment length polymorphism'*), DHPLC (*'denaturing high-performance liquid chromatography'*) e SNP (*'single nucleotide polymorphism'*) ou PASA (*'PCR amplification of specific alleles'*) (Corbett & Tardif, 2006). Esta última técnica foi a utilizada no presente trabalho.

A técnica que usa marcadores SNPs, é uma reação de PCR modificada, também conhecida como PASA, ARMS (*'amplification refractory mutation system'*) e AS-PCR (*'allele specific PCR'*) (Délye *et al.*, 2002b; Wangkumhang *et al.*, 2007). Em marcadores SNPs, há diferença de apenas um nucleotídeo entre a sequência de dois alelos (R e S, por exemplo). A partir desta diferença desenha-se uma sequência nucleotídica iniciadora que possui o nucleotídeo diferencial entre os alelos R e S, localizado no nucleotídeo terminal 3', tornando-se alelo específica (Ugozzoli & Wallace, 1991). Esta sequência irá parear perfeitamente apenas com um dos alelos (comumente o que causa a resistência), porém se diferenciará do outro alelo (susceptível). Por causa desta diferença na extremidade, a extensão do DNA pela enzima DNA polimerase é muito menos eficiente

que no alelo com perfeito pareamento (Petruska *et al.*, 1988), havendo amplificação preferencial do alelo específico (R). Alternativamente, a sequência nucleotídica iniciadora também poderá ser desenvolvida para parear com o tipo silvestre e não com o mutante (Newton *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1989; Sommer *et al.*, 1989).

Esta técnica também é usada como marcador neutro para detecção de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) no genoma do organismo (Wangkumhang *et al.*, 2007). Marcadores SNPs compreendem variações que ocorrem no genoma na maioria dos organismos (Cho *et al.*, 1999). Outros tipos de marcadores moleculares baseados em SNPs foram desenvolvidos, como CAPS (*'cleaved amplified polymorphic sequences'*) (Konieczny & Ausubel, 1993) e um derivado deste marcador, o dCAPS (Michaels & Amasino, 1998; Neff *et al.*, 1998). Marcadores CAPS detectam polimorfismos que ocorrem em locais de restrição e dCAPS são formados durante a amplificação na reação de PCR pela introdução de um local de restrição no SNP usando sequências nucleotídicas iniciadoras específicas (Ugozzoli & Wallace, 1991).

PCR de alelo específico apresenta limitações na detecção de SNPs porque, na maioria dos casos, apenas uma mudança no final 3' não é suficiente para a discriminação entre dois alelos (Kwok *et al.*, 1990; Cha *et al.*, 1992; Kwok *et al.*, 1994). Por este motivo, visando aumentar a especificidade destes marcadores, ou seja, aumentar a confiabilidade na amplificação e na discriminação entre indivíduos, Drenkard *et al.* (2000) desenvolveram um PCR de alelo específico modificado, chamado de SNAP (*'single-nucleotide amplified polymorphisms'*), onde foram inseridos nucleotídeos adicionais *'mismatch'* nas segundas ou nas terceiras bases a partir do final 3'. Este tipo de AS-PCR (SNAP) foi utilizado no presente trabalho para diagnóstico de arroz vermelho resistente a imidazolinonas. É importante destacar que, para desenvolvimento de marcadores SNAP, além do conhecimento prévio da mutação envolvida na resistência aos herbicidas é necessário o

conhecimento da sequência nucleotídica que circunda esta mutação, que pode se constituir em uma característica única de cada espécie, população ou até mesmo indivíduo.

Casos de indivíduos resistentes a herbicidas vêm sendo diagnosticados pela utilização de PCR de alelo específico. Assim, nas espécies *Alopecurus myosuroides* e *Lolium rigidum* foi detectada uma substituição de isoleucina por leucina no gene ACCase, conferindo resistência aos herbicidas do grupo dos inibidores da ACCase (Délye *et al.*, 2002a; Délye *et al.*, 2002b). Da mesma forma, a mutação G<sub>2096</sub>S na enzima ACCase confere resistência ao herbicida diclofop-methyl em biótipos da espécie *Phalaris paradoxa* (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006). A partir dessa informação, os mesmos autores desenvolveram a técnica PASA para identificar resistência aos inibidores de ACCase em plantas individuais.

Kadaru *et al.* (2008), utilizando um marcador do tipo SNP para diagnosticar a presença da mutação que provoca a substituição de aminoácidos S<sub>653</sub>D, diagnosticaram 483 indivíduos de arroz vermelho com esta mutação e outros 145 indivíduos F2 provenientes do cruzamento entre arroz vermelho e a cultivar de arroz CL 121 foram selecionados com a presença de G<sub>654</sub>E. Como demonstrado nestes trabalhos, a utilização de marcadores moleculares em estudos de resistência aos herbicidas identifica esta característica em elevado número de indivíduos com precisão. Ainda, estes marcadores, quando associados a mutações na enzima alvo na qual o herbicida causa seu efeito, também representam uma eficiente técnica de determinação não somente da ocorrência da resistência, mas também do mecanismo pelo qual esta evoluiu no indivíduo em análise. Além disto, estes marcadores moleculares também podem ser utilizados em estudos de fluxo gênico entre plantas.

## 2.9 Fluxo gênico

Fluxo gênico é um processo envolvendo duas etapas incluindo a polinização entre espécies sexualmente compatíveis, seguido de introdução de alelos ou genes novos em uma população receptora, a partir de outra população (Gealy *et al.*, 2003). Trabalhos têm mostrado a possibilidade de cruzamentos naturais entre arroz cultivado comercial e arroz vermelho, bem como a ocorrência de plantas daninhas resistentes aos herbicidas, inclusive o arroz vermelho (Messeguer *et al.*, 2004; Rajguru *et al.*, 2005; Boyd, 2005).

Algumas culturas possuem espécies silvestres onde pode haver compatibilidade sexual. O fluxo gênico das culturas para os tipos silvestres pode adicionar novos genes a essas plantas introduzindo combinações inéditas. Estas combinações podem ocasionar impacto substancial na evolução das populações silvestres, resultando em plantas daninhas mais agressivas (Colwell *et al.*, 1985; Arias & Rieseberg, 1994; Arriola & Ellstrand, 1997). Um clássico exemplo de hibridização ocorreu entre o sorgo cultivado (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e o sorgo selvagem (*Sorghum propinquum* (Kunth) Hitchc.), resultando no capim-massambará (*Sorghum halepense* (L.) Pers), uma das principais espécies de planta daninha no mundo (Paterson *et al.*, 1995). A ocorrência de fluxo gênico vem sendo avaliada em diversas regiões do mundo pelo uso de marcadores genotípicos ou fenotípicos. Nesse sentido, Cheetham (2004) encontrou fluxo gênico de, aproximadamente, 1 % entre genótipos de arroz transgênico resistente aos herbicidas imidazolinonas e arroz não-transgênico, em condições climáticas de baixa umidade relativa do ar no estado da Califórnia, EUA, utilizando o gene PAT como marcador. Fluxo gênico de 0,68 % foi encontrado em condições de elevada umidade relativa do ar no estado da Louisiana, EUA, entre plantas de arroz cultivado resistente a herbicidas imidazolinonas e arroz vermelho (Zhang, 2006). Em estudo similar, realizado no estado do Rio Grande do Sul, foi encontrado fluxo gênico nas taxas de 0,065 % (Villa *et al.*, 2006) e de 0,042 % (Benitez, 2003). No estado do Arkansas, USA, plantas de arroz vermelho resistentes foram



confirmadas como híbridas pelo uso de marcadores do tipo microsatélite, sendo que a taxa de fecundação cruzada foi maior quando cruzado com a cultivar de arroz CL 161 (0,008 %) do que com a CL 121 (0,003 %). A distância máxima de fluxo detectada foi de 6 m (Shivrain *et al.*, 2007).

Uma das causas da variação da taxa de fluxo gênico refere-se à distância em que as plantas se encontram em relação à planta doadora de pólen, sendo este considerado um importante parâmetro no seu estudo. Assim, no município de Alegrete (RS) a distância máxima encontrada entre a planta doadora de pólen e uma planta que produziu sementes híbridas foi de 10 m (Brunes *et al.*, 2007). Segundo estes autores, considerando essa distância entre a fonte polinizadora e a receptora, encontram-se, em média, 94.200 plantas (área de 314 m<sup>2</sup>, com densidade de 300 plantas m<sup>-2</sup>), 471.000 panículas ou, ainda, 47 milhões de sementes, aproximadamente. A uma taxa conservadora de 0,1 % de fecundação cruzada e assumindo que todas as inflorescências estejam receptivas tem-se a possibilidade de serem obtidas 4710 sementes híbridas entre o arroz vermelho e o arroz cultivado, a partir de uma só planta de arroz vermelho. Na geração seguinte, essas sementes híbridas podem dar origem a cerca de 3532 plantas, que produzirão grãos com tegumento com coloração vermelha.

Os resultados em relação ao fluxo gênico também divergem em função das diferenças nas condições ambientais entre os experimentos, que afetam a viabilidade do pólen, do biótipo de arroz vermelho e da cultivar de arroz cultivado resistente utilizada, da coincidência na época de florescimento, da estatura da planta de arroz vermelho e arroz cultivado e das distâncias horizontal e vertical entre as plantas envolvidas (Dillon *et al.*, 2003; Estorninos *et al.*, 2003; Gealy *et al.*, 2003; Shivrain *et al.*, 2006; Villa *et al.*, 2006; Zhang, 2006).

O gene ALS de dois acessos de arroz vermelho resistente a imazethapyr provenientes do estado de Arkansas, EUA, foi sequenciado, sendo a sequência de

1935 pares de bases idêntica a do arroz cultivado (Sales *et al.*, 2008). Segundo estes autores, o alinhamento da sequência de nucleotídeos identificou seis bases polimórficas nas quais três resultaram em substituição de aminoácidos no gene ALS e uma destas substituições foi G<sub>654</sub>E, sendo esta a mesma mutação encontrada nas cultivares de arroz cultivado CL 121 e CL 141. No mesmo trabalho, foi encontrada outra mutação, a V<sub>669</sub>M, sendo esta a primeira mutação descrita para acessos de arroz vermelho resistente, suportando a hipótese de que esta resistência se deva a um processo natural de evolução advindo da pressão de seleção com o herbicida.

O arroz vermelho resistente pode estar evoluindo tanto em função da pressão de seleção gerada pelo herbicida como pela ocorrência de fluxo gênico entre a planta daninha e o arroz cultivado resistente (Sales *et al.*, 2008). Uma das consequências destes fenômenos é a perda da possibilidade da utilização de herbicida para controle de arroz vermelho, que hoje é a principal estratégia de controle desta planta daninha em lavouras de arroz. Logo, para manutenção da estratégia de uso de cultivares de arroz resistentes será necessário o controle do arroz vermelho antecedendo o florescimento, para reduzir a ocorrência da polinização cruzada entre arroz cultivado e arroz vermelho. Ainda, a rotação de herbicidas, permitida pela rotação de culturas, pode reduzir a introgressão de genes de resistência a imidazolinonas em arroz vermelho pela redução na pressão de seleção nestas populações (Gealy *et al.*, 2003).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Frente ao surgimento de biótipos de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imidazolinonas há necessidade em se desenvolver métodos expeditos para identificação da resistência a estes herbicidas. Deste modo, a primeira etapa deste trabalho consiste no desenvolvimento de métodos de avaliação da resistência aos herbicidas imidazolinonas através de bioensaios que permitam o diagnóstico da resistência em três fases do ciclo de desenvolvimento do arroz: sementes, plântulas e afilhos.

A segunda etapa deste trabalho consiste na utilização de ferramentas moleculares no diagnóstico e na identificação do mecanismo de resistência aos herbicidas imidazolinonas. Assim, por meio da identificação da sequência nucleotídica do gene acetolactato sintase, presente nas principais cultivares de arroz resistentes utilizadas no estado do Rio Grande do Sul, foi possível o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo '*single nucleotide amplified polymorphism*' (SNAP). O diagnóstico do mecanismo de resistência aos herbicidas em populações de arroz vermelho foi realizado, em uma terceira etapa, pela utilização de marcadores SNAP, com vistas a proporcionar monitoramento de lavouras de arroz e o desenvolvimento de estratégias de sustentabilidade do controle de arroz vermelho.

#### 3.1 Bioensaios para diagnóstico da resistência aos herbicidas

Foram conduzidos bioensaios em três estádios de desenvolvimento do ciclo do arroz: sementes, plântulas e afilhos. Estes experimentos visaram o desenvolvimento de metodologias expeditas para o diagnóstico da resistência aos herbicidas inibidores da

enzima ALS em arroz. O herbicida Only<sup>®</sup> foi utilizado nestes bioensaios, sendo formado pela mistura dos herbicidas imazethapyr (75 g i.a. L<sup>-1</sup>) + imazapic (25 g i.a. L<sup>-1</sup>), que pertencem ao grupo químico das imidazolinonas. Este herbicida foi escolhido por ser o produto recomendado com a utilização das cultivares de arroz resistente aos herbicidas imidazolinonas. Os materiais vegetais utilizados nos experimentos foram as cultivares de arroz IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL, sendo estas consideradas resistentes ao herbicida, e a cultivar IRGA 417 que é suscetível a este herbicida. No desenvolvimento destes bioensaios de diagnóstico de resistência foram utilizadas essas cultivares de arroz para obtenção dos padrões de metodologia e das doses discriminantes a serem utilizados na determinação da resistência de sementes, plântulas ou plantas de arroz vermelho advindas de situações reais de campo.

Nos experimentos que utilizaram plantas, estas foram obtidas da seguinte forma: as sementes passaram pelo processo de pré-germinação, que consistiu na embebição em água por um período de 24 horas, com posterior retirada da água e manutenção à sombra, em temperatura ambiente, por mais 24 horas. A semeadura procedeu-se após o término deste procedimento. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, localizada nas dependências do Departamento de Plantas de Lavoura, da Faculdade de Agronomia da UFRGS. O solo utilizado foi coletado na Estação Experimental de Arroz, do Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA), localizada na região da Depressão Central, no vale do Rio Gravataí, em Cachoeirinha/RS. Nesta região, predominam os solos da classe Gleissolos e Planossolos, frequentes nas áreas de várzeas dos rios e nas planícies lagunares. Estas plantas foram acondicionadas em vasos plásticos com capacidade para 5 L. Estas unidades experimentais foram mantidas em tanques de concreto desenvolvidos especialmente para cultivo de arroz irrigado, onde uma lâmina de água de aproximadamente cinco centímetros acima da superfície do solo foi mantida constante com uso de bóias (Figura 1). As semeaduras foram realizadas quinzenalmente durante o período de 23/09/2007 a

5/12/2007, objetivando a obtenção de plantas em diferentes estádios de desenvolvimento para os diversos bioensaios.



FIGURA 1. Tanques de concreto utilizados para desenvolvimento das plantas de arroz cultivado.

A análise dos dados dos cinco experimentos, com exceção do primeiro experimento, referente ao bioensaio de sementes, foi realizada através do pacote “drc” do programa “R” (Ritz *et al.*, 2006), pelo ajuste da equação logística de três parâmetros:

$$f(x, (b, d, e)) = \frac{d}{1 + \exp\{b(\log(x) - \log(e))\}}$$

em que  $f(x)$  representa o parâmetro a ser estimado,  $d$  representa o limite superior da curva,  $b$  é a inclinação da curva no ponto em que esta produz a metade da resposta entre os valores inferior e superior, e o parâmetro  $e$ , também conhecido como ED50, é a dose em que é produzida metade da resposta entre os limites inferior e superior. O fator de resistência (FR) foi obtido pela relação do GR50 entre a cultivar resistente e a suscetível.

A escolha do tipo de equação logística utilizada em cada experimento foi em função do melhor ajuste dos dados experimentais aos parâmetros das equações, ou seja, aquela equação em que os dados analisados mostraram diferenças estatísticas significativas. Nos bioensaios de embebição de sementes em que se avaliou o comprimento do coleóptilo e a porcentagem de germinação, o melhor ajuste foi à equação logística de

quatro parâmetros, enquanto nos demais bioensaios o melhor ajuste dos dados foi obtido utilizando a equação logística de três parâmetros com o mesmo limite superior.

### **3.1.1 Bioensaio de embebição de sementes**

Para o bioensaio de sementes foram realizados dois experimentos. Em ambos, foram determinados curvas de dose-resposta de sementes de arroz cultivado submetidas a diferentes concentrações do herbicida. As concentrações utilizadas foram 0; 0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 mM. Estas foram definidas a partir de experimentos preliminares, baseados em ensaios de embebição de sementes descritos por Kuk *et al.* (2003), em que se obtiveram as melhores respostas em relação às variáveis analisadas.

No primeiro experimento foram avaliados o comprimento do coleóptilo e a porcentagem de germinação de sementes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 cultivares x 9 concentrações), sendo o fator A as cultivares IRGA 422 CL e IRGA 417 e o fator B as nove concentrações do herbicida acima descritas, com quatro repetições, totalizando 72 unidades experimentais. Inicialmente as sementes foram embebidas por 24 horas nas soluções de cada tratamento do herbicida. Cada unidade experimental foi composta por 50 sementes, dispostas em papel para germinação, o qual foi enrolado e colocado em sala de crescimento na temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com iluminação constante obtida pelo uso de lâmpadas fluorescentes. O comprimento do coleóptilo e a porcentagem de germinação foram determinados aos sete dias após a transferência das sementes para o papel germinador. Neste período as sementes foram mantidas umedecidas com água. O comprimento do coleóptilo foi medido com o auxílio de uma régua e os dados foram transformados em relação à porcentagem da testemunha não tratada. A análise foi realizada pelo pacote “drc” do programa “R” (Ritz *et al.*, 2006) pelo ajuste da equação logística de quatro parâmetros descrita no item 2.7.

Um segundo experimento foi realizado para determinar as curvas dose-resposta utilizando o parâmetro comprimento de raiz seminal, como variável resposta utilizando as mesmas concentrações descritas acima. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 cultivares x 9 concentrações), com quatro repetições, totalizando 144 unidades experimentais. O experimento foi conduzido da mesma forma como descrito anteriormente. O comprimento das raízes seminais foi avaliado aos sete dias após embebição nos tratamentos, onde cada repetição, contendo as 50 sementes, foi fotografada através de máquina fotográfica digital com um mega pixel de resolução, em fundo preto. O comprimento de raízes foi obtido pelo programa de domínio público IMAGE J (Rasband, 1997) (Figura 2). Os dados foram transformados em relação à porcentagem dos dados obtidos na testemunha não tratada.

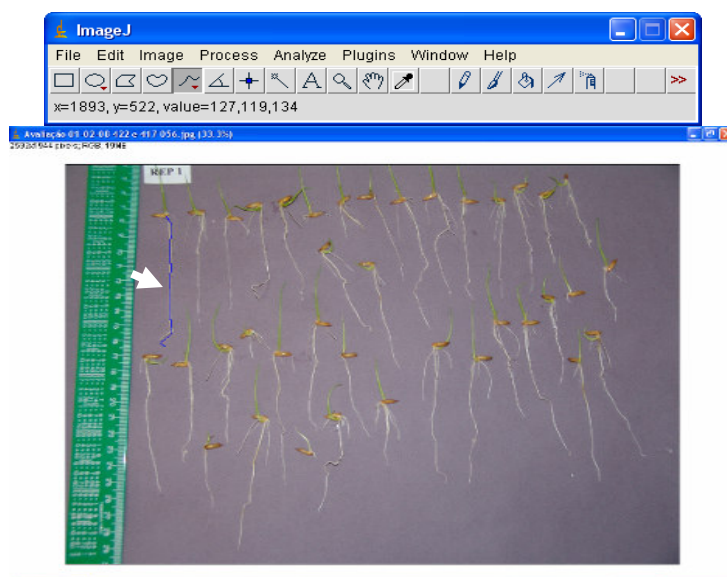


FIGURA 2. Representação da determinação do comprimento de raízes seminais obtidas a partir das sementes embebidas em diferentes concentrações dos herbicidas imazethapyr + imazapic. A seta em branco mostra a medição da raiz pelo programa IMAGE J.

### 3.1.2 Bioensaio de plântulas

Neste experimento o objetivo foi diagnosticar a resistência em arroz no estágio de plântula pela determinação de curvas dose-resposta com base no crescimento de raízes

principais. A metodologia deste bioensaio foi adaptada a partir de Kuk *et al.* (2003) e Kalsing *et al.* (2006). As sementes foram germinadas em papel de germinação, mantidas em sala de crescimento em temperatura variando de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com iluminação constante obtida através de lâmpadas fluorescentes. Cinco dias após a germinação das sementes, quando as mesmas atingiram o estágio de plântula, as raízes foram removidas porque serão a variável a ser analisada e as plântulas foram transferidas para soluções contendo 0; 0,00002; 0,0002; 0,002; 0,02; 0,2 e 2,0 M do herbicida. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 cultivares x 7 concentrações), com quatro repetições, totalizando 112 unidades experimentais. Cada unidade experimental constou de um copo plástico com capacidade de 50 ml, que recebeu 25 ml da solução herbicida de cada tratamento, contendo duas plântulas. As unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento em temperatura variando de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com iluminação constante obtida pelo uso de lâmpadas fluorescentes. O comprimento de raízes principais novas foi avaliado aos 7 dias após a transferência das plântulas para os respectivos tratamentos. As plantas foram fotografadas com um mega pixel de resolução, em fundo preto, e o comprimento de raízes principais medido pelo programa IMAGE J (Rasband, 1997). Os dados obtidos foram transformados em relação à porcentagem da testemunha não tratada e foram analisados pelo pacote estatístico “drc” do programa “R” (Ritz *et al.*, 2006) por meio do ajuste da equação logística de três parâmetros como descrito no item 3.1.

### **3.1.3 Bioensaio de afilhos**

Este experimento objetivou o diagnóstico da resistência no estágio de emissão de afilhos, de forma a obter-se a possibilidade de diagnóstico da resistência durante o estágio vegetativo de desenvolvimento das plantas de arroz. A metodologia utilizada nesse bioensaio foi adaptada de Kim *et al.* (2000) e Hamamura *et al.* (2003). Os afilhos foram



obtidos de plantas de arroz mantidas em casa-de-vegetação quando estas estavam no estágio de V9 a V11 de acordo com a escala de Counce *et al.* (2000). Neste momento, os afilhos foram removidos do colmo principal e conduzidos para o laboratório para a condução do bioensaio.

Preliminarmente a este experimento, foram avaliados diferentes tratamentos relacionados à manutenção ou à retirada de raízes ou parte aérea e doses do herbicida para discriminação entre cultivares de arroz cultivado resistentes e suscetível. Foram avaliados afilhos inteiros (raiz e parte aérea), com remoção de raízes e manutenção da parte aérea intacta, com manutenção de apenas 1 cm de raiz e parte aérea intacta e manutenção de 1 cm de raiz e 2 cm de parte aérea. Também foram testadas soluções à base de água ou solução nutritiva e o efeito de auxina como promotora do crescimento de raízes. Os resultados destes testes indicaram que a melhor resposta foi obtida com a retirada de raízes e a manutenção da parte aérea dos afilhos, em solução à base de água nas seguintes concentrações do herbicida: 0; 0,00002; 0,0002; 0,002; 0,02; 0,2 e 2,0 M.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 cultivares x 7 concentrações), com quatro repetições, cada repetição era formada por dois afilhos, totalizando 112 unidades experimentais. Cada unidade experimental constou de um copo plástico com capacidade de 100 ml, que recebeu 50 ml da solução herbicida de cada tratamento. Estas unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento em temperatura variando de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com iluminação constante obtida por lâmpadas fluorescentes. O parâmetro avaliado foi comprimento de raiz principal. A avaliação do comprimento de raízes foi realizada pela análise com o programa IMAGE J (Rasband, 1997) de fotografias digitais com resolução de um mega pixel aos 7 dias após a transferência dos afilhos para os tratamentos. Os dados obtidos foram transformados em relação à porcentagem dos dados obtidos na testemunha não tratada e

analisados pelo pacote estatístico “drc” do programa “R” (Ritz *et al.*, 2006) pelo ajuste da equação logística de três parâmetros conforme descrito no item 3.1.

### **3.2 Determinação das sequências do gene ALS em cultivares de arroz resistente aos herbicidas imidazolinonas**

O conhecimento exato da sequência nucleotídica do gene ALS das cultivares de arroz é necessário para desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para cada uma destas cultivares. O material utilizado na extração do DNA foi aproximadamente 150 mg de tecido foliar jovem das cultivares de arroz PUITÁ INTA CL, IRGA 422 CL, SATOR CL e IRGA 417. Imediatamente após a coleta, o material foi macerado em N<sub>2</sub> líquido. A extração de DNA foi realizada conforme o protocolo de Haberer *et al.* (1996). As amostras de DNA foram quantificadas com gel de agarose 1 %, utilizando marcadores de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

O isolamento do gene ALS foi realizado a partir da obtenção de sequências nucleotídicas iniciadoras específicas para o mesmo em arroz e de sua utilização em reações de PCR. As sequências nucleotídicas iniciadoras foram desenhadas com base no alinhamento de sequências do gene ALS de arroz disponíveis no GenBank (AB049822 e AB049823 (Shimizu *et al.*, 2000); AK109628 (NIAS, 2003) ; AK242817 (KNIAS, 2003); AY885675 e AY885674 (Rajguru *et al.*, 2005); DQ516977, DQ516978, DQ516979, DQ516980 e DQ516981 (Shivrain *et al.*, 2006); NM001059172 e NM001053466 (Ohyanagi *et al.*, 2006); e EF576591 (Kumari *et al.*, 2007)). A escolha destas sequências foi feita com base no alinhamento de sequências do mesmo gene em arroz, fornecidas no programa computacional BLASTN 2.2.20 (Zhang *et al.*, 2000). A grande homologia entre estas sequências, como por exemplo, a sequência AY885675 (Rajguru *et al.*, 2005) é 86 % similar a DQ516978 (Shivrain *et al.*, 2006), serviu de parâmetro de escolha para obtenção das sequências nucleotídicas iniciadoras que foram utilizadas para amplificação das regiões

do gene ALS nas cultivares de arroz. As sequências nucleotídicas iniciadoras foram obtidas com auxílio do programa PRIMO PRO 3.4 PCR *PRIMER DESIGN*, disponível na URL: <http://www.changbioscience.com/primo/primo.html> (Zhu, 2002). Este programa permite a obtenção de diferentes sequências nucleotídicas iniciadoras pela plotagem de uma sequência referência conhecida. Os critérios de seleção da melhor sequência nucleotídica iniciadora basearam-se na temperatura de pareamento de 55°C, sequências de no máximo 20 pb e na maior porcentagem das bases nitrogenadas guanina e citosina, ou seja, pelo maior conteúdo G/C (Wangkumhang *et al.*, 2007).

As sequências nucleotídicas iniciadoras escolhidas foram estabelecidas para amplificação de regiões de 44 a 1038 pb, compreendendo os domínios CAD, BE e a região entre estes, chamada de região F. A figura 3 mostra uma representação hipotética do gene em que são apresentados a direção de amplificação das sequências nucleotídicas iniciadoras utilizadas neste trabalho e os tamanhos dos fragmentos correspondentes as regiões CAD, BE e F do gene ALS.

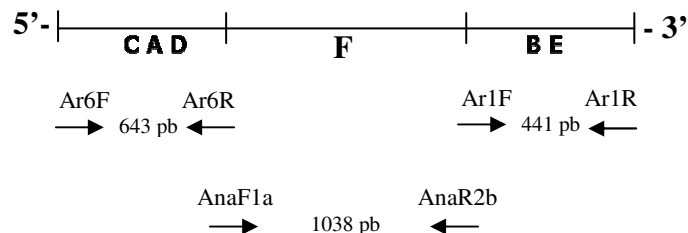


FIGURA 3. Esquema hipotético mostrando as regiões do gene ALS com 1935 pb e as principais sequências nucleotídicas iniciadoras que foram utilizados no presente trabalho para amplificação das regiões.

Para amplificação da região CAD foi utilizado o par de sequências nucleotídicas iniciadoras denominado Ar6 (*Ar6F-forward* e *Ar6R-reverse*), amplificando um fragmento de aproximadamente 643 pb. Para obtenção da região BE foram testados três pares de sequências nucleotídicas iniciadoras denominadas: Ar1 (*Ar1F-forward* e *Ar1R-reverse*),

Ar2 (Ar2F-*forward* e Ar2R-*reverse*) e Ar5 (Ar5F-*forward* e Ar5R-*reverse*) resultando em fragmentos de, aproximadamente, 441, 581 e 365 pb respectivamente (Tabela 1).

TABELA 1. Descrição das sequências nucleotídicas iniciadoras utilizadas na obtenção das sequências do gene ALS nas regiões que compreendem os domínios CAD e BE do gene

Primer	Sequência	Tamanho (pb) <sup>1</sup>	TP (°C) <sup>2</sup>	Fragmento	GC (%) <sup>3</sup>	Região
Ar1F	5'-CATTGAGGAGTTGGCATTGA-3'	20	55	441 pb	60	BE
Ar1R	5'-TGGGTCATTGAGGTCAAACA-3'	20	55		60	BE
Ar2F	5'-AGGGGAGGCAATCATCGCTAC-3'	21	56	581 pb	61	BE
Ar2R	5'-CACAGTCTGCCATCACCATC-3'	21	56		60	BE
Ar5F	5'-TCCGCATTGAGAACCCTCCCTGTG-3'	23	55	365 pb	59	BE
Ar5R	5'-AGATTAATACACAGTCCCTGCCATC-3'	24	55		60	BE
Ar6F	5'-CCAAGACCGGCCGTAAGAAC-3'	20	64	643 pb	60	CAD
Ar6R	5'-TGTCCTTGGGGATGTCGACC-3'	20	64		59	CAD

<sup>1</sup>pb – Pares de bases;

<sup>2</sup>TP – Temperatura de pareamento;

<sup>3</sup>GC – Porcentagem do conteúdo de guanina e citosina.

Para amplificação da região F do gene foram testadas quatro sequências nucleotídicas iniciadoras que amplificam na direção *forward* denominadas AnaF1a, AnaF1b, AnaF2a e AnaF2b e mais quatro sequências nucleotídicas iniciadoras que amplificam na direção *reverse* denominadas AnaR1a, AnaR1b, AnaR2a e AnaR2b (Tabela 2). O tamanho dos fragmentos obtidos variou de acordo com a combinação das sequências que foram utilizadas, variando de 44 a 1038 pb (Tabela 3).

TABELA 2. Descrição das sequências nucleotídicas iniciadoras utilizadas na obtenção das sequências do gene ALS na região F do gene ALS

Primer	Sequência	Tamanho (pb) <sup>1</sup>	TP(°C) <sup>2</sup>	GC(%) <sup>3</sup>
AnaF1a	5'-CCCGCGTCATACAGGAAG-3'	18	60	61
AnaF1b	5'-CCTTCTCCTCGCGTCCTC-3'	19	62	63
AnaF2a	5'-TTGATCCAGCAGAGATTGGA-3'	20	59	45
AnaF2b	5'-GGGTTTGTGATGATCGTGTGAC-3'	20	60	50
AnaR1a	5'-AGCAGAGCATTCAAGCCCTGT-3'	21	64	55
AnaR1b	5'-TGACACATGTGGTTGCTTG-3'	19	59	45
AnaR2a	5'-TGCACAACCATACCCAAATG-3'	20	60	45
AnaR2b	5'-AACCTATCCTCCATTGCAC-3'	20	59	50

<sup>1</sup>pb – Pares de bases;

<sup>2</sup>TP – Temperatura de pareamento;

<sup>3</sup>GC – Porcentagem do conteúdo de guanina e citosina.

TABELA 3. Tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) gerados com as sequências nucleotídicas iniciadoras que amplificam a região F do gene ALS

Reverse Forward	AnaR1a	AnaR1b	AnaR2a	AnaR2b
AnaF1a	582	536	1023	1038
AnaF1b	554	508	995	1010
AnaF2a	90	44	531	546
AnaF2b	160	114	601	616

As reações de PCR foram adaptadas de Rajguru *et al.* (2005) e Whaley *et al.* (2007) e seguiram o seguinte protocolo: 50 ng de DNA, 0,166  $\mu$ M de cada sequência nucleotídica iniciadora (*forward* e *reverse*) (Integrated DNA Technologies - IDT), 0,166 mM deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) (Invitrogen), 0,2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1x tampão (Invitrogen), 1,3  $\mu$ L de DMSO 100% e 1,5 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen), em um volume total de 30  $\mu$ L por reação. As reações de PCR foram sujeitas a 3 minutos de desnaturação a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, e 1,5 minutos a 72°C, e por fim 10 minutos 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  $\mu$ L ml<sup>-1</sup>, por 120 minutos a 110 V em tampão TBE 0,5X (40 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8,0). Após, cada gel foi fotografado com auxílio do programa KODAK DIGITAL SCIENCE 1D.

Os amplicons encaminhados para sequenciamento foram obtidos com a utilização das sequências nucleotídicas iniciadoras descritas acima (Tabelas 1 e 2). A exceção foram aqueles obtidos com a utilização de Ar2F e Ar2R pelo motivo de não apresentarem bandas únicas nos géis. Nestes, a banda correspondente ao tamanho esperado foi cortada do gel e purificada pelo uso do kit para purificação de DNA GFX (Amersham Biosciences). Como os demais amplicons obtidos corresponderam bandas únicas, estes foram purificados direto da solução de reação de PCR pelo uso do kit para purificação de DNA GFX (Amersham Biosciences).

O sequenciamento do DNA foi realizado através do equipamento ABI 3100 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems), no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFRGS. As sequências obtidas foram editadas pelo programa BIOEDIT Versão 7.0.9, disponível na URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> (Hall, 1997). Após, estas sequências foram alinhadas 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 *Bromus tectorum* (AF488771) (Park *et al.*, 2002), *Arabidopsis thaliana* (X51514) (Sathasivan *et al.*, 1990) e do arroz cultivado (AB049822) (Shimizu *et al.*, 2000). Finalmente, as sequências de cada cultivar de arroz cultivado foram agrupadas em um fragmento único de 1923, 1926, 1912 e 1842 pb para IRGA 417, PUITÁ INTA CL, IRGA 422 CL e SATOR CL, respectivamente. Estas sequências foram depositadas no GeneBank sob os códigos de acesso bankit1215813, bankit1215820, bankit1215821 e bankit1215823, para as cultivares PUITÁ INTA CL, IRGA 417, IRGA 422 CL e SATOR CL, respectivamente.

### **3.3 Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo ‘*single nucleotide amplified polymorphism*’ (SNAP)**

Com base na confirmação da mutação e na obtenção da exata composição nucleotídica do gene ALS obtidas no trabalho anterior, foram desenvolvidas as sequências nucleotídicas iniciadoras específicas to tipo SNAP para cada cultivar de arroz pelo programa WEBSNAPER (<http://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/snap3/websnaper3.cgi>) (Wangkumhang *et al.*, 2007) de tal forma que a base nucleotídica do final 3’ fosse específica ao nucleotídeo que confere a resistência. Desta forma, o final 3’ da sequência iniciadora alelo específica parecia no alelo correspondente do indivíduo a ser testado e continua a elongação. Porém no indivíduo suscetível não haverá elongação da fita de DNA porque o mesmo não possui a base mutada presente no resistente (Figura 4). Visando

aumentar a especificidade destes marcadores, ou seja, aumentar a confiabilidade na amplificação, foi inserido um nucleotídeo adicional ‘*mismatch*’ nas segundas ou nas terceiras bases a partir do final 3’, como sugerido por Drenkard *et al.*, (2000) e Wangkumhang *et al.* (2007) (Figura 4).

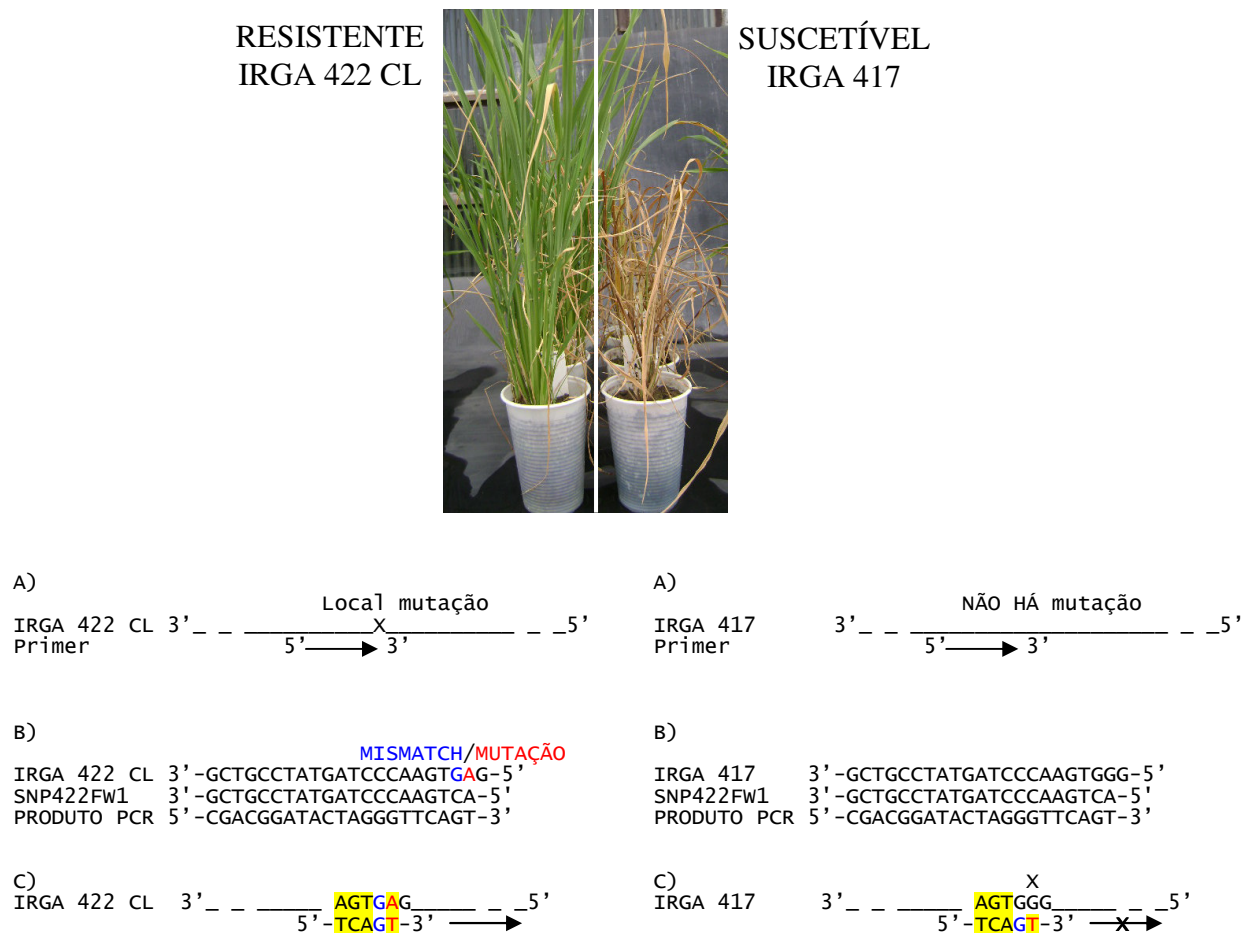


FIGURA 4. Esquema mostrando o princípio de funcionamento da utilização da metodologia SNAP. A) Sequência do indivíduo resistente (destacando o local da mutação) e suscetível mostrando a direção de amplificação com utilização da sequência nucleotídica iniciadora em questão; B) Alinhamento das sequências, mostrando a base mutada (vermelho) e a base adicional *mismatch* (azul) no resistente, e o produto gerado pela reação de PCR com utilização do SNP422FW1 e C) Pareamento durante a reação e continuação da elongação na cultivar resistente e parada na elongação na suscetível.

Para cada mutação encontrada nas cultivares foram desenhados dois marcadores SNAPs. Deste modo, para a mutação G<sub>654</sub>E, encontrada em IRGA 422 CL, foram

desenvolvidos os SNAPs denominados de SNP<sub>422</sub>FW1 e SNP<sub>422</sub>FW2. Para as mutações S<sub>653</sub>D e A<sub>122</sub>T, encontradas em SATOR CL e PUITÁ INTA CL respectivamente, foram desenvolvidos SNP<sub>Sat</sub>FW1, SNP<sub>Sat</sub>FW2, SNP<sub>Pta</sub>Rev1 e SNP<sub>Pta</sub>Rev2 (Figura 5). Na tabela 4 encontra-se a descrição dos marcadores SNAPs utilizados.

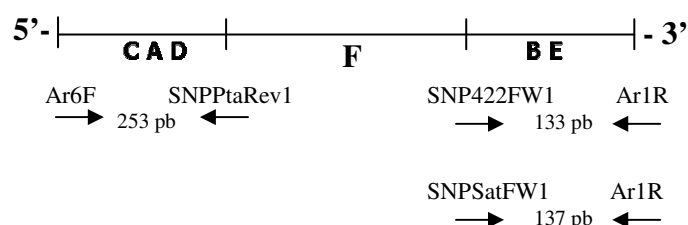


FIGURA 5. Esquema hipotético mostrando os polimorfismos gerados com a utilização dos marcadores SNAP, bem como a direção na amplificação durante a reação de PCR.

As reações de amplificação e a visualização dos amplicons foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1, exceto para o número de ciclos da PCR que foi reduzido para 30 ciclos, para evitar a ocorrência de falsos positivos. Amostras de DNA de todas as cultivares avaliadas foram amplificadas com os marcadores SNAPs, para distinguir cultivares. Foram realizadas cinco repetições para cada reação.

TABELA 4. Descrição das sequências dos marcadores do tipo ‘*single nucleotide polymorphism*’ (SNAP) utilizadas no diagnóstico de indivíduos resistentes aos herbicidas imidazolinonas

Mutação	Nome do SNAP e sequência	Modificação
G <sub>654</sub> E	SNP422FW1 5'-GCTGCCTATGATCCCAAGTCA-3'	Segunda base a partir do final 3' (G/C)
	SNP422FW2 5'-GCTGCCTATGATCCCAAGGGA-3'	Terceira base a partir do final 3' (T/G)
S <sub>653</sub> D	SNPSatFW1 5'-ATGTGCTGCCTATGATCCCATA-3'	Segunda base a partir do final 3' (A/T)
	SNPSatFW2 5'-GTGCTGCCTATGATCCCGAA-3'	Terceira base a partir do final 3' (A/G)
A <sub>122</sub> T	SNPPtaRev1 5'-CCTGGTGGATCTCCATGGACTT-3'	Segunda base a partir do final 3' (G/T)
	SNPPtaRev2 5'-CTGGTGGATCTCCATGGAGGT-3'	Terceira base a partir do final 3' (C/G)



### **3.3.1 Determinação do mecanismo de resistência em indivíduos de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imidazolinonas através da utilização de marcadores SNAP**

Para identificação do mecanismo de resistência de indivíduos de arroz vermelho coletados como escapes ao controle dos herbicidas imazethapyr + imazapic em lavouras de arroz do estado do RS foram utilizados os marcadores moleculares SNAPs descritos anteriormente. O material vegetal deste estudo foi cedido pela Herbologia, do Instituto Rio Grandense do Arroz, e corresponde a 16 populações de arroz vermelho coletadas na safra 2006/07 e a 22 populações coletadas na safra de 2007/08. A resistência aos herbicidas imazethapyr + imazapic nas populações de 2006/07 foram obtidas das descrições apresentadas por Menezes *et al.* (2008), enquanto que a confirmação da resistência nas populações de 2007/08 foi recentemente realizada e ainda não publicada (Menezes, Mariot e Oliveira, comunicação pessoal).

O material vegetal da safra 2006/07 constituiu-se das seguintes populações, com respectivos locais de origem entre parênteses: 198BN (Cacequi), 172BN (Rosário), 38BN (Palmares), 182BN (Restinga Seca), 133BN (Caçapava do Sul), 53AN (Guaíba), 60BN (Cachoeira do Sul), 98 BN (Viamão), 144BN (São Francisco de Assis), 15BN (Alegrete), 22AN (Palmares), 04BN (Rio Pardo), 223 BN (Santa Maria), 75BN (São Lourenço), 109BN (São Pedro) e 31BN (Rio Grande). O material vegetal da safra 2007/08 constituiu-se das seguintes populações com respectivos locais de origem entre parênteses: 267BN (Rosário do Sul), 265BN (Rosário do Sul), 136BN (Agudo), 66BN (Alegrete), 47MN (Caçapava do Sul), 48MN (São Martinho da Serra), 49MN (São Martinho da Serra), 50MN (Santa Maria), 51MN (Santa Maria), 274MN (Uruguaiana), 207MA (Camaquã), 201MA (Camaquã), 212MA (Dona Francisca), 208MA (Camaquã), 206MA (Camaquã), 32AN (Restinga Seca), 235AN (São Gabriel), 90AN (Cachoeira do Sul), 124AN (Novos Cabrais), 25AN (Restinga Seca), 135AN (Dona Francisca) e 66AN (Alegrete). Ambos

grupos de populações foram classificados em um experimento baseado na análise visual da fitointoxicação resultante da aplicação dos herbicidas imazethapyr + imazapic nas doses de 75 + 25 e 150 + 50 g i.a. ha<sup>-1</sup>, respectivamente, e em comparação com as cultivares IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e IRGA 417. Esta classificação originou as denominações dos níveis de resistência: baixo nível (BN), médio nível (MN), médio-alto nível (MA) e alto nível de resistência (AN).

A confirmação fenotípica da resistência do material da safra 2006/07 foi realizada em experimento conduzido em casa-de-vegetação localizada nas dependências do Departamento de Plantas de Lavoura, da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em Porto Alegre-RS. As condições experimentais foram as mesmas descritas no item 3.1. Foram semeadas 20 sementes da cada população, e posterior a germinação foram mantidas apenas 15 plantas por população. No momento em que as plantas estavam com três a quatro folhas expandidas, foi realizada a aspersão dos herbicidas imazethapyr + imazapic. Por ocasião da aplicação, a umidade relativa do ar era de 89 % e a temperatura de 21°C. Para aplicação utilizou-se um pulverizador costal manual a CO<sub>2</sub>, com pressão de 35 lb pol<sup>-2</sup>, bicos 110.02 AD, simulando uma vazão de 200 L.ha<sup>-1</sup>. A análise da resistência deu-se aos 28 dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas, em que se avaliou os níveis de injúria visuais causados nas plantas, sendo estas classificadas como: baixo nível de resistência (BN) quando apresentavam mais de 50 % de folhas cloróticas e paralisação total do crescimento, médio nível de resistência (MN) quando apresentavam de 5-20 % de folhas cloróticas e redução parcial no crescimento e alto nível de resistência (AN) quando apresentavam até 5 % de folhas cloróticas e nenhuma paralisação de crescimento. Anteriormente à aplicação dos herbicidas, foram feitas coletas de material vegetal dos biótipos da safra 2006/07 para extração de DNA. A planta cujo material vegetal foi coletado foi identificada para posterior análise fenotípica da resistência. De cada população foram coletadas amostras de

15 plantas. Porém algumas das amostras foram perdidas durante os procedimentos de extração de DNA. A extração de DNA seguiu o descrito no item 3.2.1.

Os indivíduos de arroz vermelho resistentes provenientes da safra 2007/08 foram previamente classificados em diferentes níveis de resistência em experimento realizado pela Herbologia do IRGA. Assim, a coleta desse material foi realizada diretamente das plantas já selecionadas com o herbicida. A coleta do material vegetal e os procedimentos de extração de DNA ocorreram de forma semelhante ao anteriormente descrito. Porém, nesta safra ocorreram variações dentro das populações em relação ao número de plantas coletadas para extração de DNA. Assim sendo, os marcadores SNAPs foram utilizados em 208 plantas referentes à safra de 2006/07 e em 273 plantas da safra 2007/08, totalizando 481 plantas.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O diagnóstico da resistência aos herbicidas é o ponto inicial para tomada de decisão em lavouras com infestação de daninhas. A presença de plantas daninhas sobreviventes à aplicação de herbicidas pode se dever tanto a problemas relacionados a este, às condições fisiológicas das plantas daninhas ou à presença de resistência a herbicidas nestes indivíduos. O diagnóstico precoce da razão do escape permite que sejam tomadas medidas para contenção do problema ainda na mesma estação de crescimento ou no planejamento de medidas de controle para a próxima estação.

Desta forma, buscaram-se estabelecer uma metodologia para diagnose da resistência aos inibidores da ALS em três fases do ciclo de desenvolvimento do arroz. Apesar dos bioensaios serem previstos para utilização com arroz vermelho, as avaliações foram realizadas em cultivares de arroz devido ao conhecimento prévio das suas resistências destas e, assim, consideram-se estas cultivares como padrões suscetíveis e resistentes. Por tratar-se da mesma espécie, *Oryza sativa*, os resultados poderão ser aplicados para diagnóstico em sementes ou plantas de arroz vermelho com suspeita de ocorrência de resistência a herbicidas inibidores da ALS.

### **4.1 Métodos de diagnóstico da resistência aos herbicidas em arroz**

A identificação da resistência a herbicidas em sementes torna mais rápida a tomada de decisão em lavouras com suspeita de infestação com arroz vermelho resistente. Visando estabelecer método para avaliação precoce da resistência foram determinadas curvas dose-

resposta nas cultivares de arroz IRGA 422 CL (R) e IRGA 417 (S), pelo bioensaio de embebição de sementes utilizando como variáveis resposta o comprimento do coleóptilo e a porcentagem de germinação de sementes. Neste experimento, o uso da variável comprimento do coleóptilo expresso como porcentagem da testemunha não tratada, foi adequado na expressão da resistência ao herbicida (Figura 6), enquanto a avaliação de porcentagem de germinação não foi adequada para esta determinação nas condições experimentais citadas no item 3.1.1 (Figura 7).

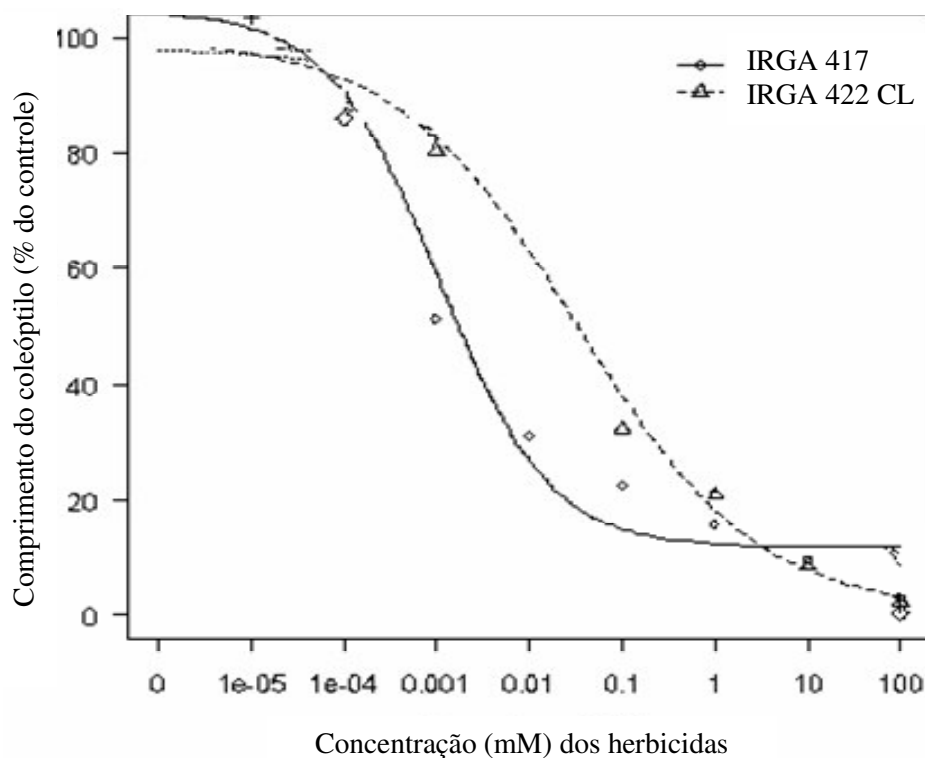


FIGURA 6. Curvas dose-resposta com relação ao comprimento do coleóptilo, expresso como porcentagem da testemunha não tratada, da cultivar de arroz irrigado resistente IRGA 422 CL e da cultivar suscetível IRGA 417, submetidas à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.

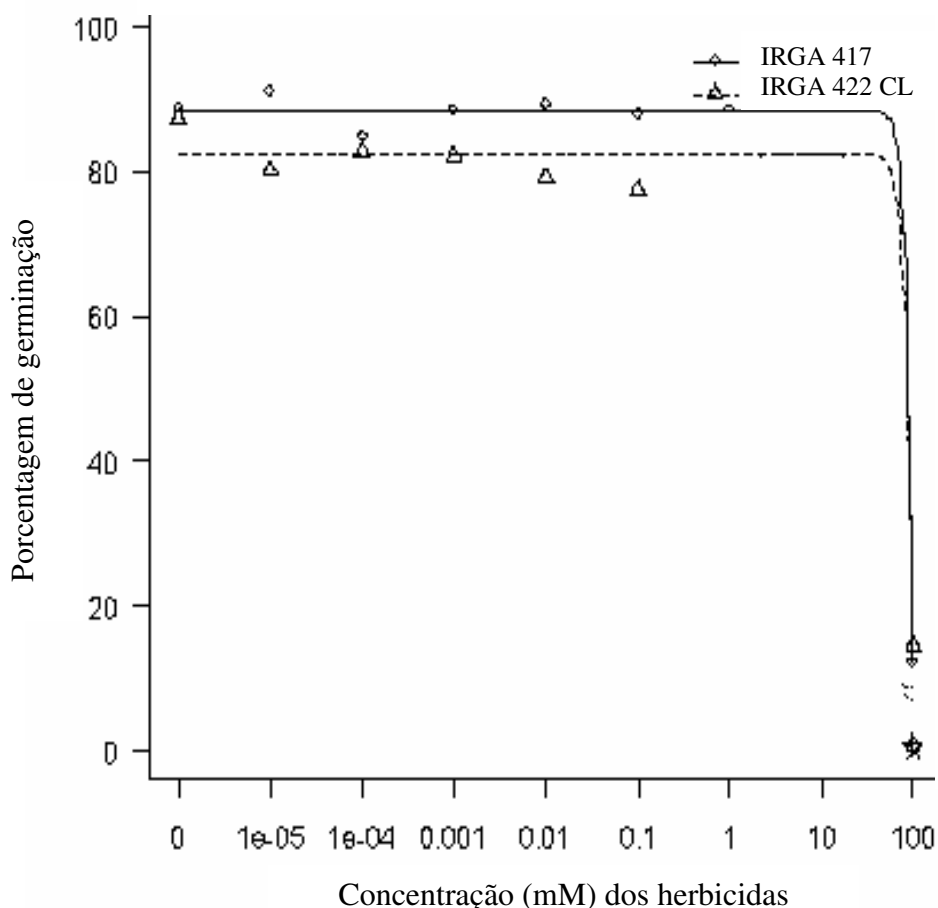


FIGURA 7. Curvas dose-resposta com relação à germinação de sementes, da cultivar de arroz irrigado resistente IRGA 422 CL e da cultivar suscetível IRGA 417, submetidas à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.

Ocorreu diferença entre a cultivar resistente (R) e a cultivar suscetível (S) em relação ao comprimento do coleóptilo (Tabela 5). Aos 7 dias após a embebição, as concentrações dos herbicidas, necessária para reduzir o comprimento do coleóptilo em 50 % (GR50) para as cultivares R e S, foram de 0,03 e 0,001 mM, respectivamente. Dessa forma a cultivar IRGA 422 CL foi 31 vezes mais resistente que IRGA 417 (Tabela 5). Burke *et al.* (2006), avaliando o comprimento de coleóptilo de biótipos R e S de *Sorghum halepense*, encontraram fatores de resistência de 18 e 35 para os herbicidas clethodim e fluazifop, respectivamente, mostrando que o parâmetro comprimento de coleóptilo também foi adequado na discriminação entre biótipos R e S.

TABELA 5. Parâmetros da equação logística e fator de resistência (FR) com relação ao comprimento do coleóptilo, expresso como porcentagem da testemunha não tratada, da cultivar de arroz irrigado resistente IRGA 422 CL e da cultivar suscetível IRGA 417, submetidas à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic

Cultivares	Declividade ( <i>b</i> )	Limite inferior ( <i>c</i> )	Limite superior ( <i>d</i> )	GR50	FR ± Desvio erro
IRGA 417	0,73**	11,71**	104,63**	0,001**	31,08 ± 12,87*
IRGA 422 CL	0,45**	0,57 <sup>ns</sup>	99,89**	0,03*	

\*\* P < 0,01; \* P < 0,05; <sup>ns</sup>Não significativo.

Já a variável porcentagem de germinação de sementes não discriminou os materiais utilizados neste experimento. Porém, em estudo realizado por Kuk *et al.* (2003) o biótipo R da planta daninha *Monochoria vaginalis* foi 230 vezes mais resistente que o biótipo S ao herbicida imazosulfuron, utilizando porcentagem de germinação como variável resposta. As diferenças relacionadas à quantidade e ao tipo de reservas protéicas e o início da necessidade de síntese de aminoácidos podem estar relacionadas a estes efeitos na germinação de sementes.

Quando avaliadas todas as quatro cultivares, o comprimento da raiz, expresso em relação à porcentagem da testemunha não tratada, também foi uma variável apropriada à identificação da suscetibilidade aos herbicidas (Figura 8), pois a curva que representa a cultivar IRGA 417 mostra a suscetibilidade deste material em relação às outras cultivares que são resistentes aos herbicidas (Tabela 6).

TABELA 6. Parâmetros  $b^1$ ,  $d^2$  e GR50<sup>3</sup> da equação logística de três parâmetros e fator de resistência (FR) das cultivares de arroz, no bioensaio de sementes referente ao comprimento de raiz

Cultivares	<i>b</i>	GR50		Fator de Resistência	
		Concentração (mM)	IC <sup>4</sup> 95%	FR <sup>5</sup>	IC <sup>4</sup> 95%
IRGA 417	0,30	0,10	(0,09 - 0,11)		
IRGA 422 CL	0,35	0,29	(0,26 - 0,32)	2,91	(2,07 - 3,75)
PUITÁ INTA CL	0,37	0,86	(0,78 - 0,94)	8,67	(6,16 - 11,18)
SATOR CL	0,38	1,75	(1,58 - 1,92)	17,67	(12,54 - 22,80)

<sup>1</sup>*b* Declividade da curva;

<sup>2</sup>*d* (Limite superior) = 98,1 para todas as cultivares;

<sup>3</sup>GR50 Dose dos herbicidas imazethapyr + imazapic que causa 50 % de redução no crescimento de raiz;

<sup>4</sup>IC Intervalo de confiança a 95% de probabilidade;

<sup>5</sup>Fator de resistência = GR50 da cultivar resistente/GR50 de IRGA 417.

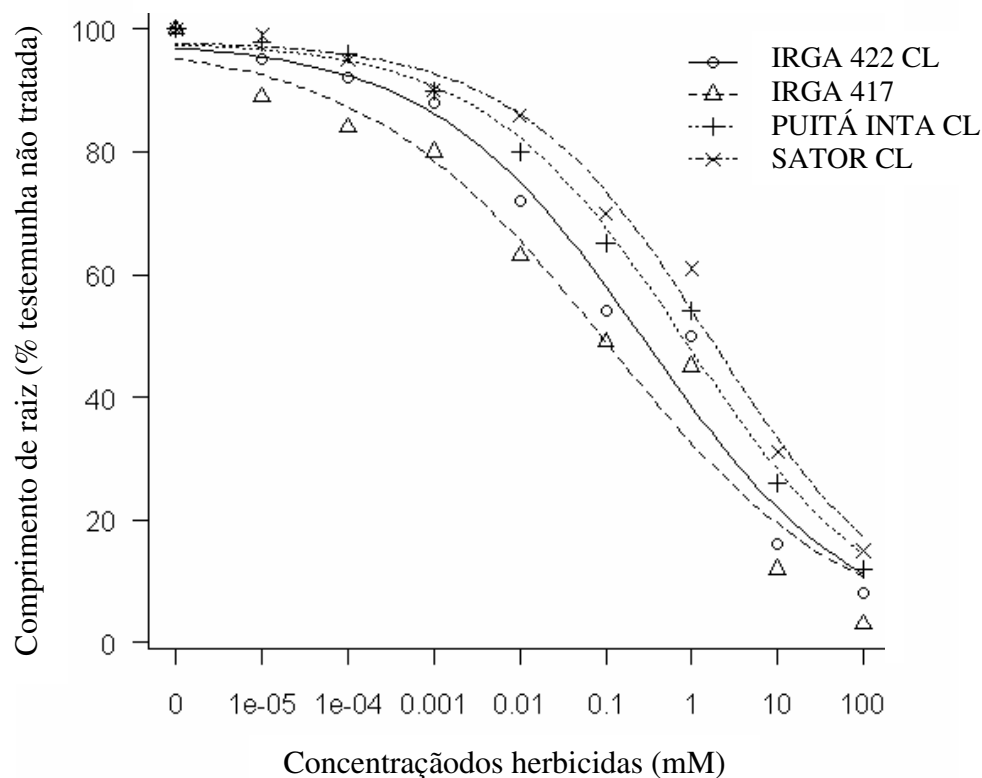


FIGURA 8. Curvas dose-resposta do comprimento da raiz expressos em relação à porcentagem da testemunha não tratada, de cultivares de arroz irrigado submetidos à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.

Pelo ajuste da equação logística de três parâmetros, com o limite superior comum às três curvas, foi possível diagnosticar diferença estatística significativa em relação ao parâmetro  $e$ , também conhecido como GR50, ou seja, a dose em que é produzida metade da resposta entre os limites inferior e superior da curva. O fator de resistência (FR) obtido pela relação entre as GR50 das cultivares R e S, mostrou que as cultivares IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL são 3, 18 e 9 vezes mais resistentes que IRGA 417 (Tabela 6). Comparando as cultivares resistentes SATOR CL e PUITÁ INTA CL foram significativamente 6 e 3 vezes mais resistentes que IRGA 422 CL (Tabela 7). A diferente localização das mutações no gene ALS destas cultivares responsáveis pela resistência a herbicidas (item 3.3 deste trabalho) pode ter causado diferentes níveis de resistência, devido às mudanças da conformação da enzima ALS e à importância específica do aminoácido mutado em relação à ligação de cofatores (McCourt *et al.*, 2006).



TABELA 7. Fatores de resistência (FR) estimados das cultivares de arroz irrigado resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic no bioensaio de sementes

Relação do GR50 <sup>1</sup>	FR ± Desvio Erro	Valor t <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
GR50 IRGA 422 CL/SATOR CL	0,17 ± 0,06**	-14,84	1,67.10 <sup>-14</sup>
GR50 IRGA 422 CL/PUITÁ INTA CL	0,34 ± 0,12**	-5,68	4,98.10 <sup>-6</sup>
GR50 SATOR CL/IRGA 422 CL	6,04 ± 2,05*	2,45	0,02
GR50 SATOR CL/PUITÁ INTA CL	2,04 ± 0,89 <sup>ns</sup>	1,16	0,26
GR50 PUITÁ INTA CL/IRGA 422 CL	2,97 ± 1,02*	1,91	0,04
GR50 PUITÁ INTA CL/SATOR CL	0,49 ± 0,22*	-2,35	0,03

<sup>1</sup>Relação do GR50 (dose dos herbicidas imazethapyr + imazapic que causa 50 % de redução no crescimento de raiz) das cultivares resistentes;

<sup>2</sup>Valor da estatística t de student;

<sup>3</sup>P-Valores de probabilidade a 5 % e a 1 %;

\*\*P < 0,01;

\*P < 0,05;

<sup>ns</sup>Não significativo.

O bioensaio de embebição de sementes visando à discriminação entre biótipos R e S também foi realizado por Kim *et al.* (2000), onde biótipos R de *Echinochloa colona* foram diferenciados de biótipos S através de curvas dose-resposta usando a variável comprimento de raízes. Em sementes de *Setaria viridis* embebidas em diversas doses de trifluralina pode-se diagnosticar a resistência em apenas 5 dias após a embebição nos tratamentos (Beckie *et al.*, 1990). No presente trabalho, apenas 7 dias foram suficientes para discriminar cultivares de arroz resistentes e suscetíveis mostrando, desta forma, que o método do diagnóstico da resistência pela embebição de sementes economiza tempo e espaço. Esse tipo de teste também foi realizado para detectar resistência aos herbicidas inibidores das enzimas ACCase, ALS e EPSPs (Beckie *et al.*, 2000; Tal *et al.*, 2000; Escorial *et al.*, 2001; Perez & Kogan, 2003). Os resultados apresentados no presente trabalho corroboram outros resultados encontrados em ensaios de embebição de sementes, no que se refere ao sucesso na discriminação entre R de S (Burke *et al.*, 2006; Kuk *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2000). Ainda, estes resultados mostram que o método da embebição de sementes é rápido e não trabalhoso para detecção de plantas tolerantes a herbicidas inibidores da ALS em arroz.

O método de embebição de sementes pode ser utilizado em estudos de hibridização de arroz, tendo como característica de análise o fluxo gênico do gene de resistência a herbicidas ALS entre cultivares de arroz cultivado resistentes e a planta daninha arroz vermelho. Neste caso, os dados deste trabalho indicam que as melhores doses de discriminação estão entre 0,001 e 0,1 mM para os comprimentos de raiz ou de coleóptilo. Ainda, a melhor utilização destes bioensaios para identificação de indivíduos de arroz vermelho resistente através de estudos desta natureza pode ser realizada utilizando a cultivar IRGA 422 CL e IRGA 417 como padrão conhecido de resistência e suscetibilidade, respectivamente.

A segunda fase de desenvolvimento das plantas para o qual foram desenvolvidos bioensaios foi o estágio de plântula. Neste estágio é em geral, quando ocorre maior necessidade de diagnóstico da resistência em tempo real, pois representa o estágio de aplicação dos herbicidas em lavouras comerciais de arroz. No estágio de plântula, a análise do comprimento de raiz em relação à porcentagem da testemunha não tratada, mostrou-se variável adequada na determinação da resistência (Figura 9). A diferença na redução no crescimento de raiz da cultivar suscetível IRGA 417 já pode ser observada a partir da dose 0,0002 M. Na dose de 2,0 M (Figura 9), apenas a cultivar SATOR CL apresentou raízes com comprimento aproximado maior de 10 % em relação à respectiva testemunha não tratada. Destaca-se que as cultivares IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL não tiveram curvas dose-resposta distintas entre si.

Baseado na análise estatística foi possível identificar a sobreposição dos intervalos de confiança (IC 95 %) do parâmetro GR50 das cultivares IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL, logo estas são semelhantes entre si em relação ao GR50. Porém, são consideradas resistentes porque o IC 95 % não coincidiu com o intervalo da cultivar suscetível IRGA 417 (Tabela 8). Assim, a dose de 0,004 M reduziu o comprimento de raiz da cultivar suscetível IRGA 417 em 50 %, enquanto que as doses 0,01; 0,02 e 0,04 M

reduziram pela metade o comprimento das raízes de IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL, respectivamente (Tabela 8).

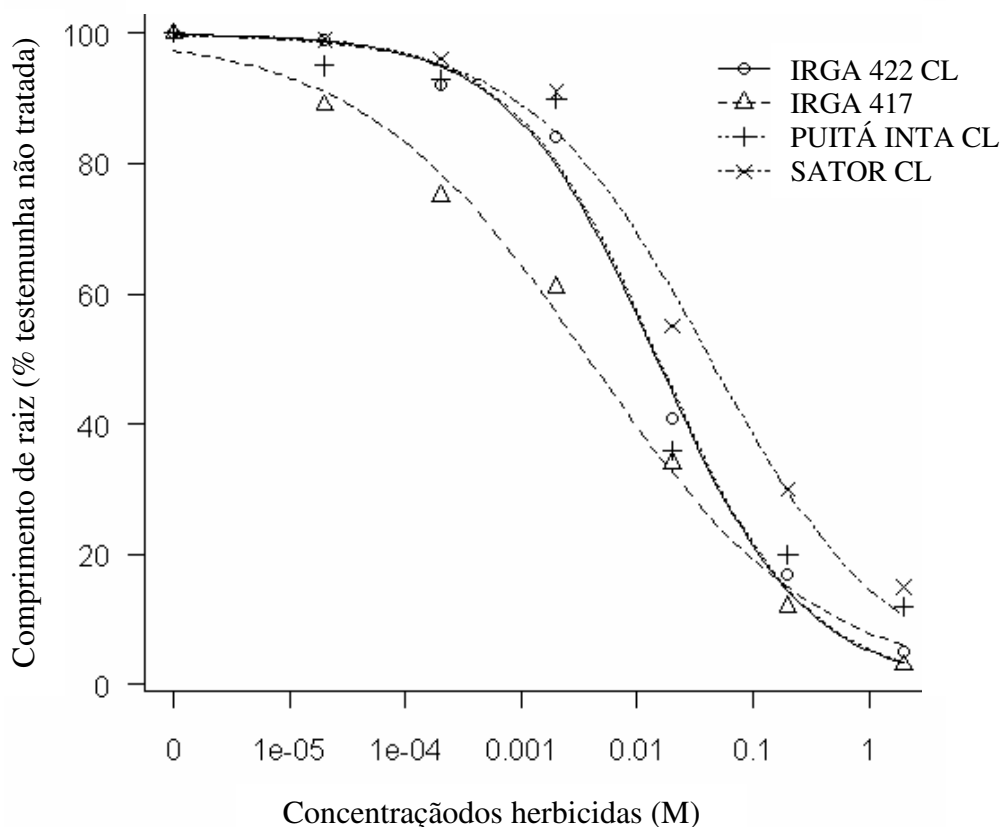


FIGURA 9. Curvas dose-resposta do comprimento da raiz expressos em relação à porcentagem da testemunha não tratada, de plântulas de cultivares de arroz irrigado, submetidas à solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.

TABELA 8. Parâmetros  $b^1$ ,  $d^2$  e  $GR50^3$  da equação logística de três parâmetros e fator de resistência (FR) das cultivares de arroz, no bioensaio de plântulas referente ao comprimento de raiz

Cultivares	$b$	GR50		Fator de Resistência	
		Concentração (M)	IC <sup>4</sup> 95%	FR <sup>5</sup>	IC <sup>4</sup> 95%
IRGA 417	0,44	0,0038	(0,003 - 0,004)		
IRGA 422 CL	0,68	0,0147	(0,013 - 0,016)	3,86	(2,71 - 5,01)
PUITÁ INTA CL	0,69	0,0154	(0,014 - 0,017)	4,05	(2,82 - 5,28)
SATOR CL	0,56	0,0432	(0,039 - 0,046)	11,31	(7,88- 14,74)

<sup>1</sup> $b$  Declividade da curva;

<sup>2</sup> $d$  (Limite superior) = 99,9 para todas as cultivares;

<sup>3</sup>GR50 Dose dos herbicidas imazethapyr + imazapic que causa 50 % de redução no crescimento de raiz;

<sup>4</sup>IC Intervalo de confiança a 95% de probabilidade;

<sup>5</sup>Fator de resistência = GR50 da cultivar resistente/GR50 de IRGA 417.

Em relação ao fator de resistência, as cultivares IRGA 422 CL, PUITA INTÁ CL e SATOR CL foram 4, 4 e 11 vezes mais resistentes que IRGA 417. A cultivar resistente SATOR CL foi significativamente três vezes mais resistente que as demais cultivares resistentes (Tabela 9).

TABELA 9. Fatores de resistência (FR) estimados das cultivares de arroz irrigado resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic no bioensaio de plântulas

Relação R:S <sup>1</sup>	FR ± Desvio Erro	Valor t <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
GR50 IRGA 422 CL/SATOR CL	0,34 ± 0,09**	-6,95	1,26.10 <sup>-6</sup>
GR50 IRGA 422 CL/PUITÁ INTA CL	0,96 ± 0,24 <sup>ns</sup>	-0,18	0,86
GR50 SATOR CL/IRGA 422 CL	2,92 ± 0,80*	2,38	0,03
GR50 SATOR CL/PUITÁ INTA CL	2,80 ± 0,98*	1,83	0,05
GR50 PUITÁ INTA CL/IRGA 422 CL	1,04 ± 0,26 <sup>ns</sup>	0,17	0,87
GR50 PUITÁ INTA CL/SATOR CL	0,36 ± 0,13**	-5,11	0,0001

<sup>1</sup>Relação do GR50 (dose dos herbicidas imazethapyr + imazapic que causa 50 % de redução no crescimento de raiz) das cultivares resistentes;

<sup>2</sup>Valor da estatística t de student;

<sup>3</sup>P-Valores de probabilidade a 5 % e a 1 %;

\*\*P < 0,01;

\*P < 0,05;

<sup>ns</sup>Não significativo.

O bioensaio de plântulas, do mesmo modo que o bioensaio de sementes oferece grande potencial de uso na diferenciação entre biótipos de arroz cultivado resistentes e suscetíveis a herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas, sendo desta forma uma ferramenta fenotípica de diagnóstico mais disponível ao produtor. Portanto, o diagnóstico da resistência pode ocorrer com a coleta destas plântulas sob suspeita e realização da exposição das mesmas aos herbicidas imazethapyr + imazapic na concentração de 0,004 M, conforme metodologia descrita para este bioensaio. Este método mostrou-se conveniente pela rapidez, facilidade de execução, baixo custo, e ao fato dos resultados apresentarem boa precisão em relação à discriminação da resistência.

No presente estudo, a determinação dos resultados ocorreu após sete dias da implementação dos tratamentos. Bioensaios de diagnóstico da resistência aos herbicidas com plântulas foram também realizado por Portes (2005) com as espécies *Eleusine indica*,

para resistência aos inibidores de ACCase e *Bidens pilosa* e *Euphorbia heterophylla*, para resistência aos inibidores de ALS, e o período de quatro dias foi suficiente para identificar sintomas em plantas suscetíveis aos inibidores de ALS e ACCase. Variações no tamanho das plântulas e nas condições experimentais podem estar relacionadas às diferenças na duração destes períodos.

A terceira fase na qual se buscou determinar métodos de diagnose da resistência foi o período de afilamento. O comprimento de raízes em relação à porcentagem da testemunha não tratada também se mostrou variável adequada na determinação da resistência nos estádios de V9 a V11 de acordo com a escala de Counce *et al.* (2000) (Figura 10). Neste caso, já na menor dose do herbicida 0,00002 M foi possível observar diferença em relação à redução no crescimento de raiz da cultivar suscetível IRGA 417.

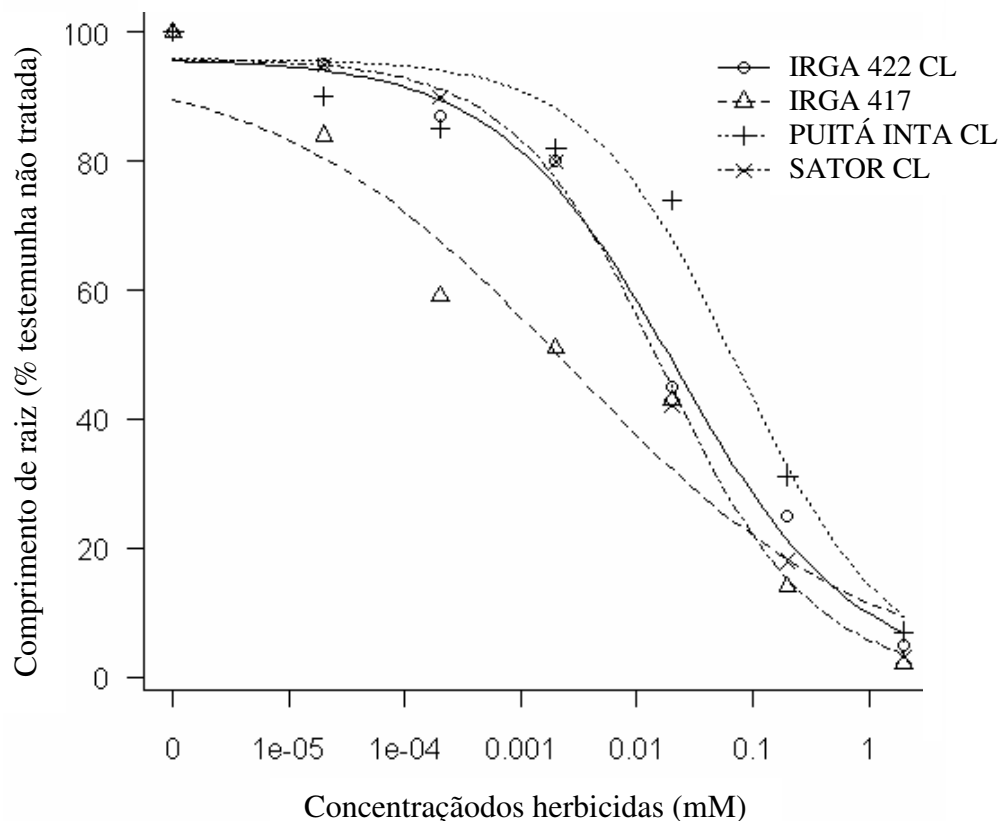


FIGURA 10. Curvas dose-resposta do comprimento da raiz, expresso em relação à porcentagem da testemunha não tratada, de afilhos de cultivares de arroz, submetidos a tratamento com solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.

As concentrações que reduziram 50 % o comprimento de raízes das cultivares IRGA 422 CL, SATOR CL, PUITÁ INTA CL e IRGA 417 foram: 0,02; 0,02; 0,08 e 0,003 M, respectivamente (Tabela 10). O IC (95 %) do GR50 da cultivar suscetível IRGA 417 não se sobrepôs ao IC (95 %) das cultivares resistentes, mostrando desta forma a significância na discriminação da resistência (Tabela 10). No bioensaio de afilhos as cultivares IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITA INTÁ CL foram respectivamente 8, 6 e 28 vezes mais resistentes que a cultivar IRGA 417 (Tabela 10).

TABELA 10. Parâmetros  $b^1$ ,  $d^2$  e GR50<sup>3</sup> da equação logística de três parâmetros e fator de resistência (FR) das cultivares de arroz, no bioensaio de afilhos referente ao comprimento de raiz

Cultivares	$b$	GR50		Fator de Resistência	
		Concentração (M)	IC <sup>4</sup> 95%	FR <sup>5</sup>	IC <sup>4</sup> 95%
IRGA 417	0,34	0,0026	(0,0023 - 0,0029)		
IRGA 422 CL	0,56	0,021	(0,019 - 0,023)	8,15	(1,4 - 14,9)
PUITÁ INTA CL	0,67	0,075	(0,067 - 0,082)	28,16	(4,9 - 51,3)
SATOR CL	0,67	0,016	(0,014 - 0,017)	6,22	(1,1- 11,4)

<sup>1</sup> $b$  Declividade da curva;

<sup>2</sup> $d$  (Limite superior) = 95,9 para todas as cultivares;

<sup>3</sup>GR50 Dose dos herbicidas imazethapyr + imazapic que causa 50 % de redução no crescimento de raiz;

<sup>4</sup>IC Intervalo de confiança a 95% de probabilidade;

<sup>5</sup>Fator de resistência = GR50 da cultivar resistente/GR50 de IRGA 417.

TABELA 11. Fatores de resistência (FR) estimados das cultivares de arroz irrigado resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic no bioensaio de afilhos

Relação R:S <sup>1</sup>	FR ± Desvio Erro	Valor t <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
GR50 IRGA 422 CL/SATOR CL	1,31 ± 0,37 <sup>ns</sup>	0,83	0,42
GR50 IRGA 422 CL/PUITÁ INTA CL	0,29 ± 0,08**	-8,39	8,07.10 <sup>-8</sup>
GR50 SATOR CL/IRGA 422 CL	0,76 ± 0,21 <sup>ns</sup>	-1,09	0,29
GR50 SATOR CL/PUITÁ INTA CL	0,22 ± 0,08**	-9,17	2,09.10 <sup>-8</sup>
GR50 PUITÁ INTA CL/IRGA 422 CL	3,45 ± 1,01*	2,43	0,03
GR50 PUITÁ INTA CL/SATOR CL	4,52 ± 1,73*	2,02	0,05

<sup>1</sup>Relação do GR50 (dose dos herbicidas imazethapyr + imazapic que causa 50 % de redução no crescimento de raiz) das cultivares resistentes;

<sup>2</sup>Valor da estatística t de student;

<sup>3</sup>P-Valores de probabilidade a 5 % e a 1 %;

\*\*P < 0,01;

\*P < 0,05;

<sup>ns</sup>Não significativo.

Dentre as cultivares resistentes, a PUITÁ INTA CL foi a mais resistente sendo três e quatro vezes significativamente mais resistente que a IRGA 422 CL e a SATOR CL, respectivamente (Tabela 11).

A análise fenotípica da resistência realizada pelo bioensaio de afilhos no presente trabalho, nos estádios do ciclo de desenvolvimento do arroz entre V9 a V11 (Counce *et al.*, 2000), da mesma forma que os demais bioensaios que foram apresentados e discutidos anteriormente, mostrou-se um parâmetro adequado para a discriminação de plantas do gênero *Oryza* resistentes e suscetíveis aos herbicidas imidazolinonas. Em um bioensaio em que foi removido 1 cm de raiz de diferentes espécies de plantas daninhas, Hamamura *et al.* (2003) diagnosticaram a resistência de *Lindernia dubia*, *Monochoria vaginalis* e *Scirpus juncooides* aos herbicidas do grupo das sulfoniluréias.

Os resultados diferem nos bioensaios realizados nas diferentes etapas de avaliação em relação ao nível de resistência das cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas. Assim, a cultivar SATOR CL foi a mais resistente nos bioensaios de sementes e plântula, enquanto que no bioensaio de afilhos a cultivar PUITÁ INTA CL foi a mais resistente. Este comportamento pode-se dever a diferenças entre cultivares, havendo requerimentos diferenciados nas diferentes fases de desenvolvimento. O que é de consenso em todos os bioensaios é a menor resistência da cultivar IRGA 422 CL em relação às cultivares SATOR CL e PUITÁ INTA CL e a suscetibilidade da cultivar IRGA 417 em relação às resistentes. Esta variação dos níveis de resistência entre estas cultivares também é observada em condições de campo em lavouras de arroz. Portanto, os métodos apresentados são discriminatórios no diagnóstico da resistência e podem ser ferramentas úteis no que diz respeito à determinação da resistência em populações de arroz vermelho coletadas em lavouras orizícolas gaúchas como escapes ao controle dos herbicidas imazethapyr + imazapic.

#### 4.2 Determinação das sequências do gene ALS em cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas

O gene ALS de arroz contém aproximadamente 1935pb (Sales *et al.*, 2008) e é composto por seis regiões conservadas, designadas como domínios no gene, sendo denominadas CAD na primeira porção do gene, BE na segunda porção do gene e domínio F entre as regiões CAD e BE (Whaley *et al.*, 2007; Merotto Jr. *et al.*, 2009). Nestes domínios foram descritas na literatura as mutações que causam resistência a herbicidas inibidores da ALS. Desta forma, visando comprovar as mutações em IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL e obter as sequências nucleotídicas que circundam as mutações causadoras da resistência, foram determinadas sequências nucleotídicas iniciadoras (Tabelas 1 e 2) que amplificassem a região que compreende os domínios CAD, BE e F. Na figura 3 pôde ser visualizado o esquema dos amplicons gerados pelas sequências nucleotídicas iniciadoras desenhadas para amplificação do gene ALS nas cultivares de arroz em análise. Para amplificação da região CAD foram utilizadas as sequências nucleotídicas iniciadoras denominadas Ar6F e Ar6R, que amplificaram um fragmento único equivalente a 643 pb em todas as cultivares (Figura 11).

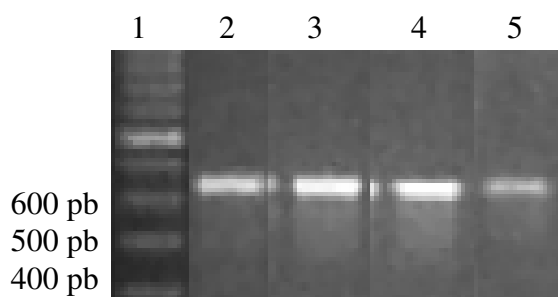


FIGURA 11. Amplificação do fragmento equivalente a 643pb para identificação da região CAD do gene ALS com as sequências iniciadoras Ar6F e Ar6R em cultivares de arroz. Colunas 1, marcador de peso molecular de 100pb; 2, PUITÁ INTA CL; 3, IRGA 422 CL e 4, IRGA 417 e 5, SATOR CL.



Para identificação da região BE foram desenhadas as seguintes sequências nucleotídicas iniciadoras: Ar1F e Ar1R; Ar2F e Ar2R; e Ar5F e Ar5R, com fragmentos esperados de aproximadamente 441, 581 e 365 pb, respectivamente (Tabela 1). Apenas a combinação das sequências iniciadoras Ar2F e Ar2R produziu mais de um fragmento, as demais amplificaram fragmento único (Figura 12).

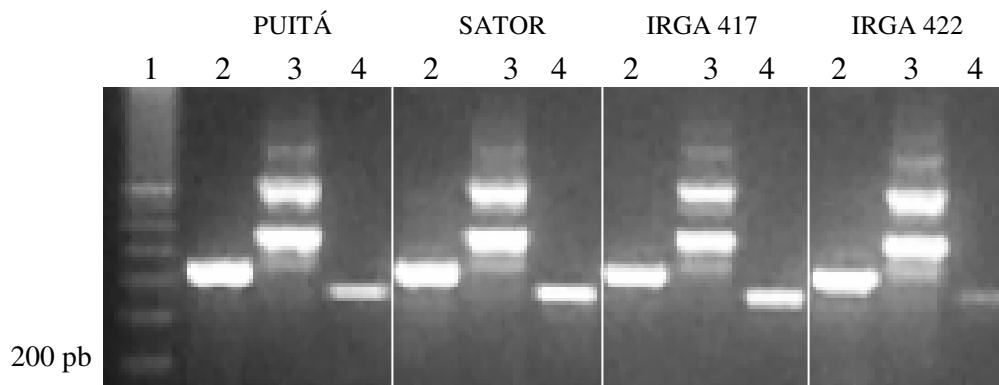


FIGURA 12. Amplificação dos fragmentos equivalente a 441, 581 e 365 pb para identificação da região BE do gene ALS de cultivares de arroz. Colunas 1, marcador de peso molecular de 100pb; 2, sequências iniciadoras Ar1F e Ar1R; 3, sequências iniciadoras Ar2F e Ar2R e 4, sequências iniciadoras Ar5F e Ar5R.

Recentemente, Whaley *et al.* (2007) descreveram uma nova mutação que confere resistência em *Amaranthus hybridus* a quatro grupos de herbicidas inibidores de ALS (SU, IMI, PTB e TP), sendo o fenótipo confirmado em arábido, que mostrou ser resistente a cinco grupos. Esta nova mutação é uma troca do aminoácido D<sub>376</sub>E e encontra-se na região F. Este local foi obtido pela utilização das sequências nucleotídicas iniciadoras descritas na tabela 2. Cada combinação testada produziu fragmento único com tamanhos de 1038, 536 e 616 pb, respectivamente para as sequências nucleotídicas iniciadoras AnaF1a e AnaR2b, AnaF1a e AnaR1b, e AnaF2b e AnaR2b (Figura 13).

As sequências nucleotídicas iniciadoras desenhadas foram eficientes na amplificação das sequências nucleotídicas correspondentes às regiões CAD (Figura 11),

BE (Figura 12) e F (Figura 13) do gene ALS. Com obtenção de fragmentos únicos, foi possível a purificação do DNA direto da solução de reação de PCR. Os fragmentos obtidos foram sequenciados para determinação da correspondente sequência nucleotídica do gene ALS para as cultivares de arroz cultivado IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL, SATOR CL e IRGA 417.

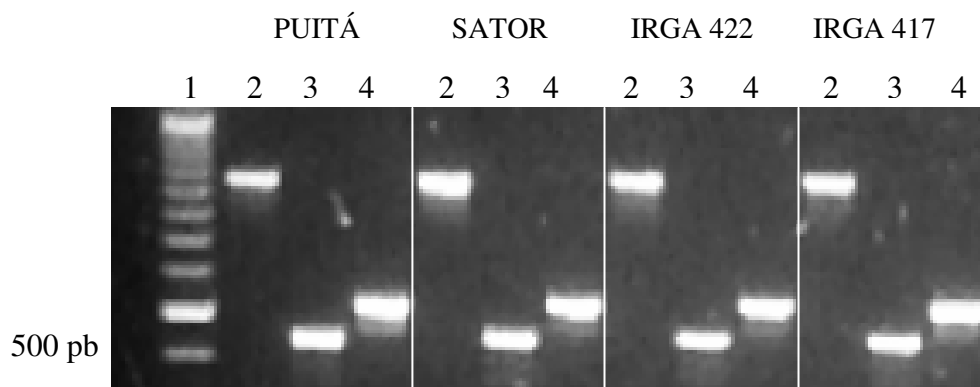


FIGURA 13. Amplificação dos fragmentos equivalente a 1038, 536 e 616 pb para identificação da região F do gene ALS de quatro cultivares de arroz. Colunas 1, marcador de peso molecular de 100pb; 2, sequências iniciadoras AnaF1a e AnaR2b; 3, sequências iniciadoras AnaF1a e AnaR1b e 4, sequências iniciadoras AnaF2b e AnaR2b.

Para comprovar se as sequências nucleotídicas obtidas das regiões CAD, BE e F se tratavam mesmo do gene ALS foi feito o alinhamento destas sequências da cultivar IRGA 417 com sequência nucleotídica conhecida do gene ALS das espécies *Oryza sativa* (GeneBank AB049822) (Shimizu *et al.*, 2000) (Figura 14), *Arabidopsis thaliana* (GeneBank X51514) (Sathasivan *et al.*, 1990) (Figura 15) e *Bromus tectorum* (GeneBank AF488771) (Park *et al.*, 2002) (Figura 16), mostrando 82, 77 e 53 % de homologia entre estas sequências, respectivamente. Desta forma, os resultados obtidos fornecem forte evidência de que se trata da sequência nucleotídica do gene ALS. No alinhamento com a sequência de arroz (AB049822) são mostrados os domínios do gene e os locais onde se encontram as mutações nas cultivares resistentes (Figura 14).

```

IRGA 417 -----
AB049822 CCGCGGCCGCGGCCGCGCCCTGTCCGCGCCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACC 120

IRGA 417 CCCGGCGAC-CCACGTCTTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGCGGCGCGGTGAGGTGCT 59
AB049822 ACCAGCGACACCACGTCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGCGGCGCGGTGAGGTGCT 180
** *****

IRGA 417 CGGCGGTGTCCCGGTACCCCGCGCTCCCGGGCGCCGCGGCCACGCCCTCCGGCCGT 119
AB049822 CGGCGGTGTCCCGGTACCCCGCGCTCCCGGGCGCCGCGGCCACGCCCTCCGGCCGT 240
*****

IRGA 417 GGGGCGCGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGTGGAGCGGTGCG 179
AB049822 GGGGCGCGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGTGGAGCGGTGCG 300
*****
DOMINIO C
IRGA 417 GCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCA122CGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA 239
AB049822 GCGTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA 360
*****

IRGA 417 CGCGCTCCCGGTATCACCAACCCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGG 299
AB049822 CGCGCTCCCGGTATCACCAACCCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGG 420
*****

IRGA 417 CGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCCGCGTCCGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCG 359
AB049822 CGTCCGGGTACGCGCGCGCTCCGGCCGCGTCCGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCCCCG 480
*****

IRGA 417 GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGTGTCTGACTCCGTCCCGATGGTCCG 419
AB049822 GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGTGTCTGACTCCGTCCCGATGGTCCG 540
*****
DOMINIO A
IRGA 417 CCATCACGGGCCAGGTP197CCCGCGCATGATCGGCACCGACA205CCCTCCAGGAGACGCCCA 479
AB049822 CCATCACGGGCCAGGTCCCGCGCATGATCGGCACCGACCCCTCCAGGAGACGCCCA 600
*****
DOMINIO D
IRGA 417 TAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACCAAGCACAAATTACCTTGTCTTGTGAGGACA 539
AB049822 TAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACCAAGCACAAATTACCTTGTCTTGTGAGGACA 660
*****

IRGA 417 TCCCCCGCTCATAACAGGAAGCCTTCTCCTCGCGTCTCCGGCCGCTCCGGCCCGGTGC 599
AB049822 TCCCCCGCTCATAACAGGAAGCCTTCTCCTCGCGTCTCCGGCCGCTCCGGCCCGGTGC 720
*****

IRGA 417 TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGA 659
AB049822 TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGCTGGGACACCTCGA 780
*****

IRGA 417 TGAATCTACCGGGTACATTGCACGCTGCCCAAGCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC 719
AB049822 TGAATCTACCGGGTACATTGCACGCTGCCCAAGCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC 840
*****

IRGA 417 AGGTCTTGCCTGCTGGTGGCGAGTACGGCGCCCGATTCTCTATGTGCGTGGTGGCTGCT 779
AB049822 AGGTCTTGCCTGCTGGTGGCGAGTACGGCGCCCGATTCTCTATGTGCGTGGTGGCTGCT 900
*****

IRGA 417 CTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGTTTGTGAGCTGACCGGCATCCAGTTACAACCA 839
AB049822 CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA 960
*****

IRGA 417 CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAGTGATGATCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGA 899
AB049822 CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGA 1020
*****
DOMINIO F
IRGA 417 TGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATGCGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTG 959
AB049822 TGCATGGCACGGTGTACGCAAATTATGCGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTG 1080
*****
D376
IRGA 417 GCGTGCGGTTTGTGATD376GATCGTGTGACAGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGA 1019
AB049822 GTGTGCGGTTTGTGATGATCGTGTGACAGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGA 1140
* *****

IRGA 417 TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAA 1079
AB049822 TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAA 1200
*****

IRGA 417 TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGTCTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTAGACCAGAGCACAA 1139
AB049822 TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGTCTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTAGACCAGAGCACAA 1260
*****

```

FIGURA 14. Alinhamento da sequência obtida da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie *Oryza sativa* (AB049822). Em destaque sublinhado os domínios do gene e as mutações descritas na literatura por causarem a resistência aos herbicidas imidazolinonas. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

IRGA 417          CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCGTGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT 1199
AB049822         CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCAATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT 1320
*****

IRGA 417          TTCCTCTGGGGTACAAGACTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCTATTCATGTGC 1259
AB049822         TTCCTCTGGGGTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGC 1380
*****

IRGA 417          TGGATGAGCTGACGAAAGGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGT 1319
AB049822         TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGCAGCACCAGATGT 1440
*****

IRGA 417          GGGCGGCACA-TATTACACCTACA-GCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG 1377
AB049822         GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGG 1500
*****

IRGA 417          GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA 1437
AB049822         GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGTCTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA 1560
*****

IRGA 417          CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTGAGGAGTTGGCATTGA 1497
AB049822         CAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTGAGGAGTTGGCATTGA 1620
*****

IRGA 417          TCCGCATTGAGAACCCTCCCGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGG 1557
AB049822         TCCGCATTGAGAACCCTCCCGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGG 1680
*****

IRGA 417          W574 DOMINIO B
AB049822         TTGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCAATAGGGCGCATACTACTGGGCAACC 1617
*                TGGTGAATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCAATAGGGCGCATACTACTGGGCAACC 1740
*                *****

IRGA 417          CAGAAATGTGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATATTC 1677
AB049822         CGAAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATATTC 1800
*                *****

IRGA 417          CTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGATA 1737
AB049822         CTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA 1860
*****

IRGA 417          CCCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA 1797
AB049822         CTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA 1920
*                *****

IRGA 417          S653 G654 DOMINIO E
AB049822         TCCCAAGTGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTATGGCAGGACTGTGTATT 1857
*                TCCCAAGTGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTATGGCAGGACTGTGTATT 1980
*                *****

IRGA 417          AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTGACTTGAATGACC 1917
AB049822         AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTGACTTGAATGACC 2039
*****

IRGA 417          CAA----- 1920
AB049822         CATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAAC 2099
*                **

IRGA 417          -----
AB049822         TATGAACCATATGCTCTTCTGTTTTACTTGTGGTGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATT 2159

IRGA 417          -----
AB049822         AGCTTCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGAT 2219

IRGA 417          -----
AB049822         ATCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAA 2279

IRGA 417          -----
AB049822         AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2301

```

FIGURA 14. (continuação) Alinhamento da sequência obtida da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie *Oryza sativa* (AB049822). Em destaque sublinhado os domínios do gene e as mutações descritas na literatura por causarem a resistência aos herbicidas imidazolinonas. Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

IRGA 417 -----CCCCGGCGAC-CCACGTCTTTCCCGCTC 26
Arabidopsis TCTCCCTAAACCCCAACAAATCATCTCTCTCTCCCGCCGCGGTATCAAATCCAGCT 480
                **** * * * * * * * *

IRGA 417 GAGGCCGGTGGGGGCGCGCGGTGAG-GTGCTCGGCGGTGCC- -CGTCAACCCCGC 83
Arabidopsis CTCCCTCTCCATCTCCGCGGTCTCAACACAACCACCAATGTCACAACCACTCCCTCTC 540
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 CGTCC- - -CCGGCGCCGCGGCCACGCCGCTCCGGCCGTGGGGGCGGCGAGCCCGCA 140
Arabidopsis CAACCAAACCTACCAAACCCGAAACATTCATCTCCCGATTGCTCCAGATCAACCCCGCA 600
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 AGGGCGCGGACATCTCTCGTGGAGGCGTGGAGCGGTGCGGCGTCAGCGAGCTGTTGCGCT 200
Arabidopsis AAGGCGCTGATATCCTCGTCGAAGCTTTAGAAGCTCAAGGCGTAGAAACCGTATTCGCTT 660
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 ACCCGGGCGGCGCTCCATGGAGATCCACCAGGCGGTGACGCGCTCCCCGGTCAACCA 260
Arabidopsis ACCCTGGAGGTGCATCAATGGAGATTCACCAAGCCTTAACCCGCTCTTCTCAATCCGTA 720
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 ACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCGGGTACGCGCGCGCT 320
Arabidopsis ACGTCTTCTCGTACGAACAAGGAGGTGATTCGACAGAGAAGGATACGCTCGATCTC 780
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 CCGGCCGCGTGGGGTCTCGTCCGACCTCCGCCCCGGGCAACCAACCTCGTGTCCG 380
Arabidopsis CAGGTAACACAGGTATCTGTATAGCCACTTCAGGTCCGCGAGCTACAAATCTCGTTAGCG 840
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 CGCTCGCCGACGCGTCTCGACTCCGTCGCGATGGTGCATCACGGGCCAGTCCCCC 440
Arabidopsis GATTAGCCGATGCGTTGTAGATAGTGTCTTGTAGCAATCACAGGACAAGTCCCTC 900
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 GCCGCATGATCGGCACCGACGCTTCCAGGAGACGCCCATAGTCGAGGTACCCCGTCCA 500
Arabidopsis GTCGTATGATTGGTACAGATGCGTTTCAAGAGACTCCGATTGTTGAGGTAACGCGTTCA 960
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 TCACCAAGCACAAATACCTTGTCTTGTGAGGACATCCCCCGCTCATAAGGAAG 560
Arabidopsis TTACGAAGCATAACTATCTGTATAGCCACTTCAGGTGTTGAAGATATCCCTAGGATTGAGGAAG 1020
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 CTTTCTTCTCGCTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCGGTGCTGGTGCATCCCCAAGGACA 620
Arabidopsis CTTTCTTTTAGCTACTTCTGGTAGACCTGGACCTGTTTGGTTGATGTTCTAAAGATA 1080
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 TCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATGAATCTACCGGGTACATTG 680
Arabidopsis TTCAACAACAGCTTGCATTCTAATGGGAACAGGCTATGAGATTACCTGTTATATGT 1140
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 CACGCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTG-AGCAGGTCTTGCCTGTTGGC 739
Arabidopsis CTAGGATGCCTAAACC- -TCCGGAAGATTCTCATTGGAGCAGATTGTTAGGTTGATTCT 1199
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 GAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGTCTGCTGATCTGGTGAATTG 799
Arabidopsis GAGTCTAAGAAGCTGTGTTGATGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 1259
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 CGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATCCAGTTACAACCACTCTGATGGCCTCGGCAAT 859
Arabidopsis GGTAGGTTTGTGAGCTTACGGGATCCCTGTTGCGAGTACGTTGATGGGCTGGGATCT 1319
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 TTCCCCAGTGATCCGTTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCAGGTGTACGCA 919
Arabidopsis TATCCTTGTGATGATGAGTTGTCGTTACATATGCTTGGAAATGCATGGGACTGTGATGCA 1379
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 AATTATGCGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTGGGTTTGTGATCGT 979
Arabidopsis AATTACGCTGTGGAGCATAGTATTTGTTGTTGGCGTTTGGGTAAGGTTTGTGATCGT 1439
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 GTGACAGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGATTGTGCACATTGACATTGAT 1039
Arabidopsis GTCACGGTAAGCTTGAAGGCTTTTGTAGTAGGGCTAAGATTGTTCAATTGATATTGAC 1499
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 CCAGCGGAGATTGAAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAATTTGCGCAGATGTTAAGCTT 1099
Arabidopsis TCGGCTGAGATTGGGAAGAATAAGACTCCTCATGTGTCTGTGTGGTGGTGGTGGTGGT 1559
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 GCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTAGACCAGAGCACAAAGACAAGTTCTGATTTT 1159
Arabidopsis GCTTTGAAGGATGAATAAGGTTCTTGAGAACCAGCGGAGGAGCTTAAAGCTTGAATTT 1619
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417 AGTGCCTGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCTCTGGGGTACAAGACT 1219
Arabidopsis GGAGTTTGGAGGAATGAGTTGAACGTACAGAAACAGAAGTTTCCGTTGAGCTTTAAGACG 1679
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIGURA 15. Alinhamento de todas as sequências obtidas da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie *Arabidopsis thaliana* (X51514). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

IRGA 417      TTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTTCATGTGCTGGATGAGCTGACGAAAGGG 1279
Arabidopsis  TTTGGGAAGCTATTCTCCACAGTATGCGATTAAGGTCCTTGATGAGTTGACTGATGGA 1739
*****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      GAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGTGGGCGGCACA-TATTACACC 1338
Arabidopsis  AAAGCCATAATAAGTACTGGTGTGCGGCAACATCAAATGTGGGCGGCAGTCTACAAT 1799
* * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      TACA-GCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCGGCTGGTCTGGGCGCAATGGGATTTGGGCTG 1397
Arabidopsis  TACAAGAAACCAAGGCAAGTGGCTATCATCAGGAGGCCCTGGAGCTATGGGATTTGGACTT 1859
**** *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      CCTGCTGCAGCTGGTCTTCTGTGGCTAACCAGGTGTACAGTTGTTGATATTGATGGG 1457
Arabidopsis  CCTGCTGCGATTGGAGCGTCTGTTGCTAACCCCTGATGCGATAGTTGGATATTGACGGA 1919
*****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      GATGGTAGCTTCTCATGAACATTCAAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCCTCCG 1517
Arabidopsis  GATGGAAGCTTTATAATGAATGTGAAGAGCTAGCCACTATTCGTGTAGAGAATCTTCCA 1979
*****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      GTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGAGGATAGG 1577
Arabidopsis  GTGAAGGTACTTTTATAAACAACCAAGCATCTTGGCATGGTTATGCAATGGGAAGATCGG 2039
*****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      TTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTTGGGCAACCCAGAATGTGAGAGTGAGATA 1637
Arabidopsis  TTCTACAAAGCTAACCAGACTCACACATTTCTCGGGATCCGGCTCAGGAGGACGAGATA 2099
** * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      TATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATATTCTCGAGTCCGTGTAACAAG 1697
Arabidopsis  TTCCCGAACATGTTGCTGTTTGCAGCAGCTTGCAGGATTCAGCGGCAGGGTGACAAAG 2159
* * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      AAGAGTGAAGTCCGTGCCCATCAAGAAGATGCTCGATACCCAGGGCCATACTTGTG 1757
Arabidopsis  AAAGCAGATCTCCGAGAAGCTATTGAGACAATGCTGGATACCCAGGACCTTACCTGTTG 2219
** * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      GATATCATCGTCCCACACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTC 1817
Arabidopsis  GATGTGATTTGTCCGACCAAGAACATGTGTTGCCGATGATCCCGAATGGTGGCACTTC 2279
*** * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      AAGGACATGATCCTGGATGGTGTGGCAGGACTGTGTTAATCTAT-AATCTGTATGTT 1876
Arabidopsis  AACGATGTCATAACGGAAGGAGATGGCCGATTAATACTGAGAGATGAAACCGGTGATT 2339
** * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      GGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTACTTGAATGACCCAA 1920
Arabidopsis  ATCAGAAC-CTTTTATGGTCTTTGTAT----- 2365

```

FIGURA 15. (continuação) Alinhamento de todas as sequências obtidas da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie *Arabidopsis thaliana* (X51514). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

```

IRGA 417      CGGCGGTGTCCCGGTACCCCGCGTCCCGGGCGCGCCGCCACGCCCTCCGGCCGT 119
Bromus tectorum  -----CTCCGGCCCT 10
*****      *

IRGA 417      GGGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG 179
Bromus tectorum  GGGGGCCGTCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG 70
*****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      GCGTCAGCGACGTGTTGCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGA 239
Bromus tectorum  GCATCGTCGACGTCTTGCCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCA 130
** * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      CGCGTCCCGGTGTCATACCAACCCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCAGGCGTTCGCGG 299
Bromus tectorum  CGGATCGCCGTCATACCAACCCTCTTCCGCCACGAGCAGGTGGAGGCGTTCGCGG 190
**** * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      CGTCCGGGTACGCGCGCGTCCGGCCGCGTCCGGGCTGCGTCCGACCTCCGGCCCG 359
Bromus tectorum  CCTCCGATACGCGCGCGTCCGGCCGCGTCCGGGCTGCGTCCGACCTCCGGCCCG 250
* * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

IRGA 417      GGGCAACCAACTCGTGTCCGCGCTGCCGACGCGTGTGCTGACTCCGTCCCGATGGTGC 419
Bromus tectorum  GGGCACCACCTCGTCCGCGCTGCCGACGCGTGTGCTGACTCCATCCCATGGTGC 310
*****      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIGURA 16. Alinhamento de todas as sequências obtidas da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie *Bromus tectorum* (AF488771). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

IRGA 417 Bromus tectorum	CCATCACGGGCCAGGTCCCCGCCGATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCA CCATCACGGGCCAGGTCCCCGCCGATGATTGGTACCGACGCTTCCAGGAGACGCCCA *****	479 370
IRGA 417 Bromus tectorum	TAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAATTACCTTGTCTTGTGATGTGGAGGACA TCGTGGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAGCACAACCTACCTGGTGCTTGTGATGTGGAGGACA * * * *	539 430
IRGA 417 Bromus tectorum	TCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCCTCGGGCCGCTCTGGCCCGGTGC TCCCCGCGTCATCAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCCTCTGGCCGCCGGGCCGGTGC *****	599 490
IRGA 417 Bromus tectorum	TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGA TGGTTGATATCCCCAAGGACATCCAACAGCAGATGGCTGTGCCTGCCTGGGACACGCCCA **** * *	659 550
IRGA 417 Bromus tectorum	TGAATCTACCGGGGTACATTGCAGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC TGAGTTTGCAGGGTACATCGCCCGCTGCCAAGCCACCATCTACTGAATCGCTTGAGC *** * * *	719 610
IRGA 417 Bromus tectorum	AGGCTTGCCTGCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTCCGGTGGTGGCTGCT AGGCTCTGCGCTGCTGGTTGGTGGAGGAAAGCGCCCAATTCTGTATGTTGGTGGTGGCTGTG *****	779 670
IRGA 417 Bromus tectorum	CTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTGAGCTGACCGGCATCCCAGTTACAACCA CTGCATCTGGCGAGGAGTTGCGCCGCTTGTGAGCTTACTGGGATTCCAGTTACAACCTA *****	839 730
IRGA 417 Bromus tectorum	CTCTGATGGGCTCGCAATTTCCCCAGTGATGATCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGA CTCTGATGGGCTTGGCAACTTCCCCAGCGACGCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGGA *****	899 790
IRGA 417 Bromus tectorum	TGCATGGCACGGTGTACGCAAATTA TCGGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCAATTTG TGCATGGCACGGTGTATGCAAATTA TCGAGTAGATAAGGCTGACCTGCTGCTTGCAATTTG *****	959 850
IRGA 417 Bromus tectorum	GCGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGA GTGTGCGGTTTGATGACCGGCTTACCAGGAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGA * *****	1019 910
IRGA 417 Bromus tectorum	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAGAACAAGCAACCACATGTGTCAA TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTCTCCA *****	1079 970
IRGA 417 Bromus tectorum	TTTGCAGATGTTAAGCTTGTCTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTAGACCAGAGCACAA TTTGTGCAGATGTCAAGCTCGCTTACAGGGGTTGAACGATCTGTTAAATGGGAGCAAAG **** * *	1139 1030
IRGA 417 Bromus tectorum	CAAAGACAAGTTCTGATTTTGTAGTGCCTGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT CACAAAAGAGTCTGGATTTTGGTCCATGGCAGGAGGAGTTGGAGCAGCAGAAGAGGACGT * * * * *	1199 1090
IRGA 417 Bromus tectorum	TTCCTCTGGGTACAAGACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCATGTGC TTCCTTAGGATACAAAACCTTTTGGTGAAGGATCCCACCGCAATATGCTATCCAGGTGC *****	1259 1150
IRGA 417 Bromus tectorum	TGGATGAGCTGACGAAAGGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGACAGCACCAGATGT TGGATGAGTTGACAAAAGGGGAGGCGATCATGGCCACCGGTGTTGGGAGCACCAGATGT *****	1319 1210
IRGA 417 Bromus tectorum	GGGCGGCACA-TATTACCTACA-GCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTGGCTGGTCTGG GGGCGGCTCAGTATTACTCTTACAAGCGGCCACGTGAGTGGCTGTCTTGGCTGGTCTGG *****	1377 1270
IRGA 417 Bromus tectorum	GCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGAGCTGGTGTCTTGTGGCTAACCCAGGTGTCA GGGCAATGGGATTTGGCTTGCAGCTGAGCTGGTGTCTTGTGGCAACCCAGGTGTCA * *****	1437 1330
IRGA 417 Bromus tectorum	CAGTTGTTGATATTGATGGGATGGTGTAGCTTCTCATGAACATTGAGGATGGCATTGA CAGTTGTTGACATTGATGGGATGGTGTAGCTTCTCATGAACATTGAGGATGGCATTGA *****	1497 1390
IRGA 417 Bromus tectorum	TCCGCATTGAGAACCTCCCGGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGG TTCGTATTGAGAACCTTCCAGTGAAGGTGATGATATTGAACAACCAACATCTGGGAATGG * * * *	1557 1450
IRGA 417 Bromus tectorum	TTGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACC TGGTCAATGGGAGGACAGGTTTTACAAGGCAAATCGGGCACACCTACCTTGGCAACC * *****	1617 1510

FIGURA 16. (continuação) Alinhamento de todas as sequências obtidas da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie *Bromus tectorum* (AF488771). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

IRGA 417 Bromus tectorum	CAGAATGTGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCAATATTC 1677 CAGAAAACGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTTC 1570 *****
IRGA 417 Bromus tectorum	CTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGATA 1737 CCGCAGTTCGTGTGACAAAAGAAGAGTGAAGTACGTGCAGCAATCCAGAAGATGCTTGACA 1630 * *****
IRGA 417 Bromus tectorum	CCCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCACACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA 1797 CCCCAGGGCCGTACTTGTGGATATCATTGTCCCGCATCAGGAGCACGTAATGCCTATGA 1690 *****
IRGA 417 Bromus tectorum	TCCCAAGTGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTATT 1857 TCCCAAGCGGTGGTGTCTTTAAGGACATCATCATGGAAGGTGATGGCAGGATCGAATATT 1750 *****
IRGA 417 Bromus tectorum	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGT--TTGACTTGAATGA 1915 AATCTA-AGTTTCGGCTACAAGACCTACAAGTGTGACATGCGTAATTAACATGTTGCCA 1809 *****
IRGA 417 Bromus tectorum	CCCAA----- 1920 GTGTGTTGTATCAACTACTAGGGTTCATCTGTGAACCATGCGTTTTCCAATTTGCTTGT 1869

FIGURA 16. (continuação) Alinhamento de todas as sequências obtidas da cultivar suscetível IRGA 417 com o gene ALS da espécie *Bromus tectorum* (AF488771). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

A linhagem 93AS3510 que foi usada para a geração da cultivar IRGA 422 CL possui a mutação G<sub>654</sub>E responsável pela resistência dita de primeira geração nas cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas ('IMI crops') (Tan *et al.*, 2005). Nas 'IMI crops' de segunda geração, a mutação corresponde a S<sub>653</sub>N, como na linhagem PWC16 que deu origem a cultivar SATOR CL (Rajguru *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005). Já a mutação que confere resistência a cultivar PUITÁ INTA CL, é a A<sub>122</sub>T (Livore *et al.*, 2003). Nas cultivares IRGA 422 CL e SATOR CL as mutações que conferem à resistência aos herbicidas imidazolinonas encontram-se no domínio E do gene. Em PUITÁ INTA CL, segundo descrição na patente da mesma (Livore *et al.*, 2003), a mutação encontra-se na região do domínio C. Esses dados constantes na literatura foram confirmados com a análise das sequências do gene ALS obtidas nas cultivares utilizadas no presente trabalho.

Para obtenção de marcadores do tipo SNP e de sua variação SNAP é necessário o conhecimento da exata sequência nucleotídica que circunda as mutações (Drenkard *et al.*, 2000). Pelo sequenciamento dos fragmentos obtidos nas reações de PCR em PUITÁ INTA CL foi confirmada a mutação A<sub>122</sub>T (Figura 17), bem como identificada



a exata sequência nucleotídica que circunda essa mutação. Nessa cultivar, o fenótipo da resistência é ocasionado pela troca da base nitrogenada guanina para adenina na primeira posição do códon. Esse tipo de substituição A<sub>122</sub>T tem conferido resistência aos grupos imidazolinonas (IMI) e pirimidiniltiobenzoatos (PTB) pertencentes aos herbicidas inibidores da ALS (Tranel & Wright, 2002). Em *Amaranthus retroflexus* foi encontrada esta mesma mutação A<sub>122</sub>T conferindo resistência as imidazolinonas, e as mutações A<sub>205</sub>V e W<sub>574</sub>L conferindo diferentes padrões de resistência dos biótipos aos herbicidas inibidores da ALS (McNaughton *et al.*, 2005). Em biótipos de *Xanthium strumarium* também foi diagnosticada resistência as imidazolinonas devido à mutação A<sub>122</sub>T (Bernasconi *et al.*, 1995). Essa mesma mutação também ocasiona resistência nas espécies *Amaranthus hybridus* (Hager *et al.*, 1998; Trucco *et al.*, 2006), *Solanum ptycanthum* (Milliman *et al.*, 2000; Milliman *et al.*, 2003) e *Amaranthus powellii* (McNaughton *et al.*, 2005).

Como pode ser observado no resultado do bioensaio de afilhos, a cultivar PUITÁ INTA CL, na qual está presente a mutação A<sub>122</sub>T, mostrou ser mais resistente que as demais cultivares de arroz resistentes. Deste modo, pelo grande número de espécies de plantas daninhas resistentes a imidazolinonas descritas atualmente, especula-se que esta mutação promova algum tipo de vantagem adaptativa, pois as plantas que apresentam esta mutação são capazes de sobreviver à pressão de seleção exercida pelo herbicida. Em arroz vermelho resistente até o presente momento não foram descritos na literatura esta mutação como causadora da resistência a imidazolinonas. Porém, resultados obtidos no presente trabalho que serão apresentados e discutidos posteriormente, mostram a presença desta mutação em arroz vermelho resistente.





biótipo da espécie *Xanthium* sp foi identificada a mutação S<sub>653</sub>A, conferindo resistência aos herbicidas do grupo das imidazolinonas (Tranel & Wright, 2002).

O elevado número de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS descritos na literatura que possuem a mutação Ser<sub>653</sub> pode ser explicado pelo fato de que esta mutação confere elevado nível de resistência, como pode ser comprovado na cultivar SATOR CL que apresentou maior nível de resistência nos bioensaios de sementes e plântula conduzidos neste trabalho. Esses resultados sugerem, que para a mutação Ala<sub>122</sub>, que esta mutação também é importante fator de seleção para sobrevivência das diferentes espécies às condições adversas nas quais estas plantas estão expostas. Em arroz vermelho resistente, não se tem relatos na literatura desta mutação. Posteriormente será discutida a presença desta mutação nas populações de arroz vermelho resistente avaliadas no presente trabalho.

As mutações descritas na literatura que causam resistência a herbicidas inibidores da ALS em plantas daninhas são: Ala<sub>122</sub>, Pro<sub>197</sub>, Ala<sub>205</sub>, Asp<sub>376</sub>, Trp<sub>574</sub> e Ser<sub>653</sub> (Heap, 2009). Logo, a mutação G<sub>654</sub>E nunca foi reportada na literatura como causadora de resistência a herbicidas imidazolinonas em plantas daninhas. De acordo com os resultados apresentados neste trabalho em relação à análise fenotípica da resistência, a cultivar IRGA 422 CL, em que a mutação G<sub>654</sub>E está presente, foi a menos resistente dentre as cultivares resistentes a imidazolinonas em todos os bioensaios conduzidos. Dessa forma, a inexistência de plantas daninhas com esta mutação sugere que esta não proporcione vantagens adaptativas significativas, sendo desta forma não selecionada durante o processo evolutivo por meio do agente de seleção herbicida.

Recentemente, Sales *et al.*(2008) identificaram esta mutação em biótipos de arroz vermelho resistente. Os resultados obtidos por estes autores estariam de acordo com a hipótese de que esteja ocorrendo à transferência do alelo da resistência para os biótipos de arroz vermelho pelo fluxo gênico. Mas estes mesmos autores identificaram uma outra

mutação inédita (V<sub>669</sub>M), contrariando esta hipótese, levantando a questão de que os biótipos de arroz vermelho resistentes estão surgindo devido a um processo de evolução da resistência independente do fluxo gênico (Sales *et al.*, 2008). Neste contexto, há outra hipótese de que populações de arroz vermelho resistente a imidazolinonas tenham surgido antes da introdução do sistema Clearfield™, suportando a idéia de que a evolução da resistência nestas populações seja advinda da pressão de seleção gerada pelos herbicidas imazethapyr + imazapic (Kuk *et al.*, 2008). No presente trabalho também foi diagnosticado a presença desta mutação nas populações de arroz vermelho resistentes avaliadas. Estes resultados serão apresentados e discutidos no item 4.3.2.

O resultado do alinhamento das sequências nucleotídicas provenientes da região F (Figura 19) mostrou que nenhuma das cultivares analisadas possui a mutação descrita por Whaley *et al.* (2007), que confere resistência aos cinco grupos de inibidores de ALS, devido à troca do aminoácido D<sub>376</sub>E. Esta mutação foi encontrada inicialmente em *Amaranthus hybridus* conferindo resistência cruzada a quatro grupos de inibidores de ALS (SU, IMI, PTB e TP). Esta resistência foi 60 a 3.200 vezes superior a do indivíduo suscetível (Whaley *et al.*, 2007). Este padrão de resistência encontrado é muito similar ao observado nas espécies com a mutação W<sub>574</sub>L (Bernasconi *et al.*, 1995). Esta mutação também gerou resistência apenas ao grupo das sulfoniluréias (>10 vezes) em *Kochia scoparia* (Warwick *et al.*, 2008).

```

                                DOMINIO F                                D376
IRGA 417      AAATTATGCGGTGGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCAATTTGGCGTGCGGTTTGATGATCG 414
PUITÁ INTA CL AAATTATGCGGTGGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCAATTTGGCGTGCGGTTTGATGATCG 413
IRGA 422 CL   AAATTATGCGGTGGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCAATTTGGCGTGCGGTTTGATGATCG 413
SATOR CL     AAATTATGCGGTGGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCAATTTGGCGTGCGGTTTGATGATCG 416
AB049822     AAATTATGCGGTGGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCAATTTGGCGTGCGGTTTGATGATCG 1099
Arabidopsis  AAATTACGCTGTGGAGCATAGTGATTTGTTGTTGGCGTTTGGGGTAAGGTTTGATGATCG 1438
***** ** ***** *   *** ***** * ** ***** ** *****

```

FIGURA 19. Alinhamento das sequências obtidas na região F do gene ALS de cultivares de arroz com a sequência do gene ALS disponível no GenBank de *Arabidopsis thaliana* (X51514) e *Oryza sativa* L. (AB049822). Similaridade entre as sequências estão representadas pelos asteriscos.

### **4.3 Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo ‘*single nucleotide amplified polymorphism*’ (SNAP) para identificação do mecanismo de resistência em arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas**

#### **4.3.1 Desenvolvimento dos marcadores SNAP**

A utilização de técnicas moleculares que permite otimizar o tempo na confirmação da resistência quando é conhecida a provável mutação causadora da resistência, vem sendo bastante utilizada, especialmente na resistência causada por alteração na enzima sobre a qual age o herbicida (Délye *et al.*, 2002b; Corbett & Tardif, 2006). A tecnologia PASA (‘*PCR-based assay specific allele*’) ou os marcadores SNP, requerem que, além do conhecimento prévio da mutação ocorrida no gene responsável pela resistência ao herbicida, exista também o conhecimento das sequências nucleotídicas que circundam esta mutação.

A mutação de G<sub>2096</sub>S na enzima ACCase confere resistência ao herbicida diclofop-methyl. A partir dessa informação foi conduzido um ensaio que utilizou a metodologia PASA para identificar a resistência em plantas individuais (Ruiz-Santaella *et al.*, 2006). Em cultivares de arroz resistentes a imazethapyr, CL 121, CL 141 e CL 161, Kadaru *et al.* (2008) também utilizaram PASA para detecção da resistência. Segundo estes autores, os marcadores SNP obtidos discriminaram satisfatoriamente biótipos R e S. Este trabalho foi realizado com as cultivares de arroz que originaram as cultivares IRGA 422 CL e SATOR CL. No entanto, mutações neutras podem resultar em diferenças nucleotídicas entre essas cultivares e, desta forma, inviabilizar a utilização de marcadores moleculares específicos como são os SNPs, quando transferidos de uma cultivar para outra.

No presente trabalho foram desenvolvidos e avaliados seis marcadores SNAPS. Todos estes marcadores mostraram-se polimórficos nas cultivares avaliadas, havendo

presença de amplicon apenas na cultivar para a qual havia sido desenvolvido o SNAP e ausência nas demais cultivares (Figura 20). Todos os SNAPs testados foram, portanto, discriminatórios na determinação da presença da mutação que gera o fenótipo da resistência nas cultivares IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL. Os amplicons gerados com a utilização destes marcadores variaram de 133 a 253 pb. A direção na amplificação utilizando estes marcadores SNAP pode ser visualizada na figura 5.

Marcadores SNAPs são mais específicos que SNPs em decorrência do “*mismatch*” adicionado nas três primeiras bases da sequência iniciadora (Drenkard *et al.*, 2000). No entanto, este procedimento pode gerar falsos positivos se a composição e o número de ciclos da reação de PCR forem inadequados. Condições menos adstringentes e elevado número de ciclos reduzem a capacidade de discriminação deste método. Esta característica tem que ser considerada quando da adoção deste tipo de marcador.

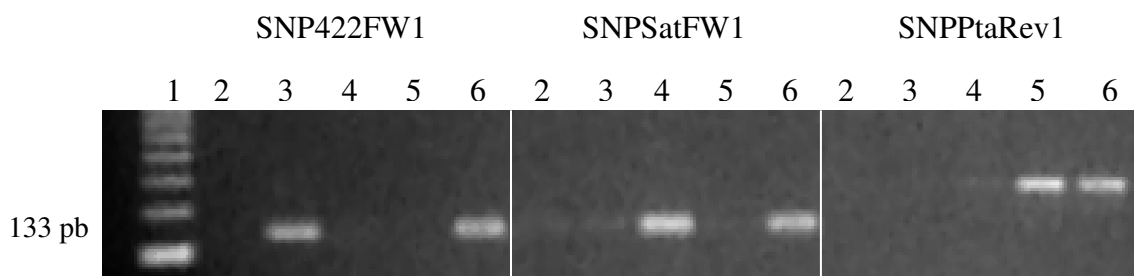


FIGURA 20. Teste da eficiência dos marcadores SNAPs no diagnóstico da mutação em cultivares de arroz. O gel agarose 2% mostra fragmentos de 133, 137 e 253 pb equivalentes aos SNP422FW1, SNPSatFW1 e SNPPtaRev1, respectivamente. Colunas: 1, marcador de peso molecular de 100bp; 2, IRGA 417; 3, IRGA 422 CL; 4, SATOR CL; 5, PUITÁ INTA CL e 6, Híbrido artificial de IRGA 417 e cultivar resistente para a qual o SNAP foi desenvolvido.

#### 4.3.2 Identificação do mecanismo de resistência em arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas pelos marcadores SNAP

O sucesso dos SNAPs na discriminação das mutações das cultivares de arroz resistente as imidazolinonas e de arroz suscetível como controle possibilitou a utilização

destes marcadores em indivíduos de arroz vermelho coletados como escapes de controle após utilização dos herbicidas imazethapyr + imazapic em lavouras de arroz do estado do RS durante as duas últimas safras 2006/07 e 2007/08. O resultado positivo nas reações de PCR utilizando estes marcadores comprova que o indivíduo em questão é resistente devido ao mecanismo de local de ação alterado. Contudo, a origem da resistência, se decorre de fluxo gênico ou a processos de evolução independente, não é possível determinar com estas análises. Esta comprovação requer avaliações de similaridade genética com marcadores moleculares neutros, como por exemplo, microssatélites (Gealy *et al.*, 2002).

A análise fenotípica de 16 populações de arroz vermelho provenientes da safra 2006/07, realizada conforme ilustrado na Figura 21 indicou nível de resistência baixo (BN) em oito populações, médio (MN) em seis populações e alto nível (AN) em apenas duas populações (Tabela 12).

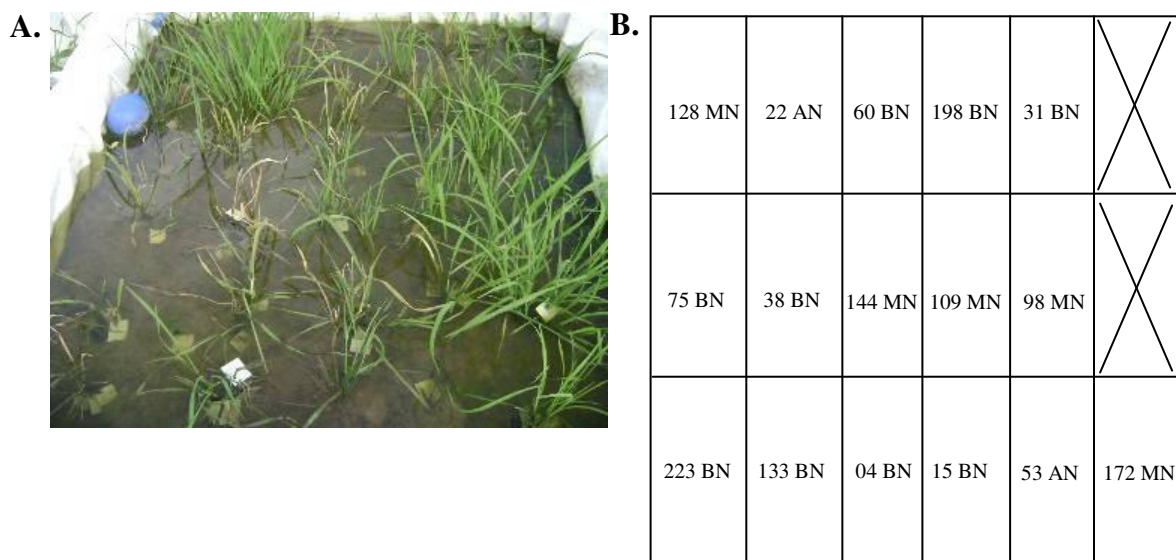


FIGURA 21. Determinação do nível de resistência de diferentes populações de arroz vermelho aos 21 dias após a aplicação dos herbicidas imazethapyr + imazapic. A) Foto mostrando plantas aos 21 DAA e B) Esquema da disposição das plantas e o nível de resistência atribuído. BN: Baixo nível de resistência; MN: Médio nível de resistência e AN: Alto nível de resistência.



TABELA 12. Descrição das 16 populações de arroz vermelho, com 15 plantas por população, coletadas na safra 2006/07 em diferentes locais do estado do RS

População	Origem	Nível de resistência <sup>1</sup>
133	Caçapava do Sul	BN
60	Cachoeira do Sul	BN
38	Palmares	BN
75	São Lourenço do Sul	BN
15	Alegrete	BN
04	Rio Pardo	BN
223	Santa Maria	BN
31	Rio Grande	BN
144	São Francisco de Assis	MN
182	Restinga Seca	MN
109	São Pedro	MN
98	Viamão	MN
198	Cacequi	MN
172	Rosário do Sul	MN
22	Palmares	AN
53	Guaíba	AN

<sup>1</sup>BN – Baixo nível; MN – Médio nível e AN – Alto nível.

A análise fenotípica das 16 populações indicou que apenas as populações 53 e 22 (12,5 % do total de populações analisadas) oriundas de Guaíba e Palmares, respectivamente, apresentaram alto nível de resistência (Figura 22). As populações 38, 133, 60, 15, 04, 223, 75 e 31 provenientes de Palmares, Caçapava do Sul, Cachoeira do Sul, Alegrete, Rio Pardo, Santa Maria, São Lourenço e Rio Grande, respectivamente, que equivalem a 50 % das populações avaliadas, foram classificadas como possuidoras de baixo nível de resistência (Figura 22). Médio nível de resistência ocorreu em 37,5 % das populações, sendo elas: 198, 172, 182, 98, 144 e 109, oriundas de Cacequi, Rosário do Sul, Restinga Seca, Viamão, São Francisco de Assis e São Pedro, respectivamente (Figura 22).

Para confirmação do mecanismo de resistência nestas populações foram utilizados os marcadores SNAPs, previamente desenvolvidos neste estudo. A presença das mutações G<sub>654</sub>E, S<sub>653</sub>D e A<sub>122</sub>T foi diagnosticada pela utilização de SNP422FW1, SNPSatFW1 e

SNPPtaRev1, respectivamente. A mutação de maior ocorrência nas populações foi a G<sub>654</sub>E (Tabela 13).

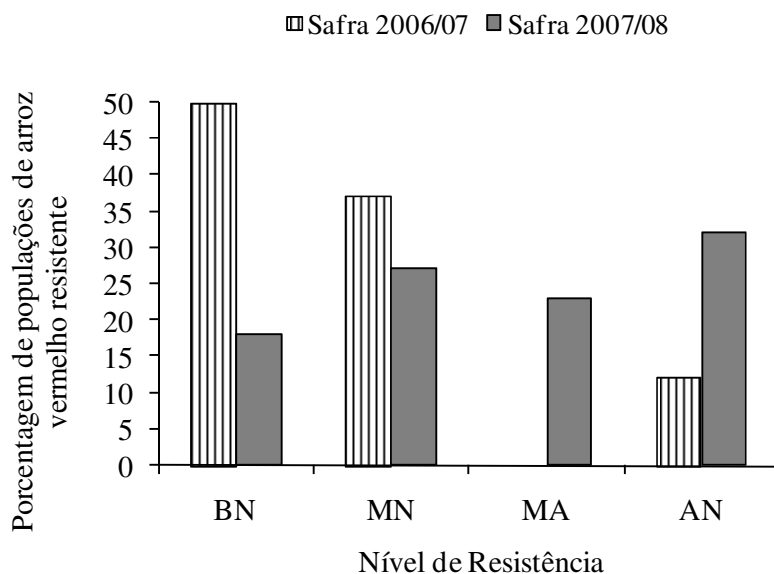


FIGURA 22. Porcentagem das populações de arroz vermelho resistente aos herbicidas imazethapyr + imazapic, provenientes das safras 2006/07 e 2007/08, classificadas quanto ao nível de resistência como alto (AN), médio-alto (MA), médio (MN) e baixo (BN).

Destaca-se que a presença da mutação não foi encontrada em todas as plantas da mesma população, contudo todas as populações possuíam pelo menos um indivíduo com esta mutação, à exceção da população 38, originária de Palmares, na qual nenhuma das mutações avaliadas pelos SNAPs foi identificada. Indivíduos contendo as outras duas mutações, S<sub>653</sub>D e A<sub>122</sub>T, isoladas ou em combinação, também foram identificados (Tabela 13). Dos 208 indivíduos avaliados, 56 % possuíam uma ou mais das mutações avaliadas. Desta forma, conclui-se que o principal mecanismo de ação responsável pela resistência aos herbicidas do grupo das imidazolinonas nestas populações está relacionado à insensibilidade da enzima ALS, devida à ocorrência de mutações no gene que a codifica.

Grande parte das populações de arroz vermelho oriundas da safra 2006/07 foi classificada como tendo baixo (50 %) e médio nível de resistência (37,5 %). A mutação presente na maioria destas populações foi a G<sub>654</sub>E. Esta mutação está presente na cultivar IRGA 422 CL (Figura 18), a qual foi a principal cultivar resistente plantada no RS nos últimos anos, sugerindo que a elevada ocorrência desta mutação se deva a fluxo gênico.

TABELA 13. Populações de arroz vermelho resistente, coletados em diferentes locais do estado do RS, provenientes da safra 2006/07 classificadas quanto ao nível de resistência aos herbicidas imazethapyr + imazapic e quanto à mutação encontrada utilizando os marcadores SNP422FW1, SNPSatFW1 e SNPPtaRev1

População	Origem	Nível de resistência <sup>1</sup>	Número de plantas	Mutação
133	Caçapava do Sul	BN	9	G <sub>654</sub> E
			6	-
60	Cachoeira do Sul	BN	1	G <sub>654</sub> E
			11	-
38	Palmares	BN	15	-
75	São Lourenço do Sul	BN	10	G <sub>654</sub> E
			1	G <sub>654</sub> E e A <sub>122</sub> T
			1	-
15	Alegrete	BN	5	G <sub>654</sub> E
			9	-
04	Rio Pardo	BN	5	G <sub>654</sub> E
			1	G <sub>654</sub> E e S <sub>653</sub> D
			3	-
223	Santa Maria	BN	1	G <sub>654</sub> E
			1	G <sub>654</sub> E e S <sub>653</sub> D
			13	-
31	Rio Grande	BN	4	G <sub>654</sub> E
			1	S <sub>653</sub> D
			1	A <sub>122</sub> T
			9	-
144	São Francisco de	MN	7	G <sub>654</sub> E
			2	G <sub>654</sub> E e S <sub>653</sub> D
			3	-
182	Restinga Seca	MN	12	G <sub>654</sub> E
109	São Pedro	MN	1	-
			12	G <sub>654</sub> E
98	Viamão	MN	2	-
			12	G <sub>654</sub> E
198	Cacequi	MN	3	-
			6	G <sub>654</sub> E
172	Rosário do Sul	MN	3	-
			8	G <sub>654</sub> E
22	Palmares	AN	2	-
			4	G <sub>654</sub> E
			3	A <sub>122</sub> T
			1	G <sub>654</sub> E e A <sub>122</sub> T
			1	S <sub>653</sub> D e A <sub>122</sub> T
53	Guaíba	AN	6	-
			7	G <sub>654</sub> E
			1	G <sub>654</sub> E e A <sub>122</sub> T
5	-			

<sup>1</sup>BN – Baixo nível; MN – Médio nível e AN – Alto nível.

A mutação S<sub>653</sub>D foi diagnosticada em cinco populações sendo elas: 223BN, 22AN, 04BN, 31BN (em apenas uma planta de cada uma destas populações) e 144MN (em duas plantas). Já a mutação A<sub>122</sub>T foi encontrada em quatro populações: 75BN, 35AN, 31BN (em apenas uma planta de cada uma destas populações) e 22AN (em cinco plantas).

Uma pequena parcela das populações de arroz vermelho resistente aos herbicidas imidazolinonas avaliadas (12,5 %) foi classificada contendo alto nível de resistência. Um fator importante a ser destacado é que nas duas populações de alto nível de resistência (22AN e 53AN) foi diagnosticada a presença da mutação A<sub>122</sub>T. Esta mutação é a responsável pela resistência aos herbicidas imidazolinonas na cultivar PUITÁ INTA CL, sendo esta dita segunda geração de cultivares resistentes aos herbicidas, ou seja, com maior nível de resistência atribuído a esta cultivar, o qual foi confirmado pelo bioensaio de afilhos (Figura 10). Em uma destas populações, a população 22AN, foi identificada um indivíduo contendo as mutações A<sub>122</sub>T e S<sub>653</sub>D, o que tem uma possibilidade muito pequena de ter ocorrido por fluxo gênico. Além disso, 39 % dos indivíduos resistentes das populações não apresentaram bandas em nenhuma reação de PCR (Tabela 13). Há possibilidade que estes indivíduos resistentes não possuam nenhuma das três mutações avaliadas. No entanto, como foram utilizados apenas SNAPs específicos para o alelo resistente e não para o alelo suscetível, é possível que estes representem falsos negativos. Para maior eficiência do método sugere-se que cada indivíduo a ser avaliado tenha seu DNA testado com SNAPs específicos para cada um dos alelos R e S.

A análise fenotípica das populações da safra 2007/08 indicou que sete populações (32 %) possuem alto nível de resistência (AN), sendo elas: 32, 235, 90, 124, 25, 135 e 66. Foram diagnosticadas como médio-alto nível de resistência (MA) cinco populações (207, 201, 212, 208 e 206), perfazendo um total de 23 %. Outras seis populações (47, 48, 49, 50, 51 e 274) foram identificadas como tendo médio nível de resistência (MN) totalizando

27 % das populações. Apenas 18 % foram classificadas como baixo nível de resistência (BN), sendo elas as quatro populações: 267, 265, 136 e 66 (Tabela 14 e Figura 22).

TABELA 14. Descrição das 22 populações de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic coletadas na safra 2007/08 em diferentes locais do estado do RS

População	Origem	Número de plantas	Nível de resistência <sup>1</sup>
267	Rosário do Sul	15	BN
265	Rosário do Sul	15	BN
136	Agudo	15	BN
66	Alegrete	7	BN
51	Santa Maria	15	MN
274	Uruguaiana	15	MN
47	Caçapava do Sul	15	MN
48	São Martinho da Serra	15	MN
49	São Martinho da Serra	15	MN
50	Santa Maria	15	MN
206	Camaquã	10	MA
207	Camaquã	15	MA
201	Camaquã	15	MA
212	Dona Francisca	15	MA
208	Camaquã	5	MA
66	Alegrete	3	AN
25	Restinga Seca	9	AN
135	Dona Francisca	15	AN
32	Restinga Seca	15	AN
235	São Gabriel	13	AN
90	Cachoeira do Sul	1	AN
124	Novos Cabrais	15	AN

<sup>1</sup>BN – Baixo nível; MN – Médio nível; MA – Médio-alto nível e AN – Alto nível.

Dos 273 indivíduos avaliados da safra 2007/08, a análise de SNAPs demonstrou que 92 %, possuíam uma ou mais das mutações analisadas neste estudo, tendo como mecanismo de resistência a alteração na enzima ALS (Tabela 15). Apenas 23 indivíduos (8 %) não apresentaram banda em nenhuma reação de PCR, podendo ser falsos negativos ou outro mecanismo de resistência que não local de ação alterado, por consequência não foi possível determinar a causa da resistência dos mesmos. Apenas 30 indivíduos (11 %) possuíam as mutações S<sub>653</sub>D ou A<sub>122</sub>T (Tabela 15).

TABELA 15. Populações de arroz vermelho resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic coletados em diferentes locais do estado de RS, provenientes da safra 2007/08 classificadas quanto ao nível de resistência e quanto à mutação encontrada utilizando os marcadores SNP422FW1, SNPSatFW1 e SNPPtaRev1

População	Origem	Nível de resistência <sup>1</sup>	Número de plantas	Mutação
32	Restinga Seca	AN	5	S <sub>653</sub> D
			1	G <sub>654</sub> E
			9	-
235	São Gabriel	AN	13	S <sub>653</sub> D
90	Cachoeira do Sul	AN	1	-
124	Novos Cabrais	AN	14	G <sub>654</sub> E
			1	-
25	Restinga Seca	AN	8	G <sub>654</sub> E
			1	G <sub>654</sub> E e S <sub>653</sub> D
135	Dona Francisca	AN	8	A <sub>122</sub> T
			1	G <sub>654</sub> E e A <sub>122</sub> T
			6	-
66	Alegrete	AN	3	G <sub>654</sub> E
207	Camaquã	MA	15	G <sub>654</sub> E
201	Camaquã	MA	15	G <sub>654</sub> E
212	Dona Francisca	MA	15	G <sub>654</sub> E
208	Camaquã	MA	5	G <sub>654</sub> E
206	Camaquã	MA	10	G <sub>654</sub> E
47	Caçapava do Sul	MN	15	G <sub>654</sub> E
48	São Martinho da	MN	12	G <sub>654</sub> E
			3	-
49	São Martinho da	MN	15	G <sub>654</sub> E
50	Santa Maria	MN	13	G <sub>654</sub> E
			2	-
51	Santa Maria	MN	15	G <sub>654</sub> E
274	Uruguaiana	MN	14	G <sub>654</sub> E
			1	G <sub>654</sub> E e S <sub>653</sub> D
267	Rosário do Sul	BN	13	G <sub>654</sub> E
			1	G <sub>654</sub> E e S <sub>653</sub> D
			1	-
265	Rosário do Sul	BN	15	G <sub>654</sub> E
136	Agudo	BN	15	G <sub>654</sub> E
66	Alegrete	BN	7	G <sub>654</sub> E

<sup>1</sup>BN – Baixo nível; MN – Médio nível; MA – Médio-alto nível e AN – Alto nível.

Em todas as seis populações de médio nível de resistência (MN), 47, 48, 49, 50, 51 e 274, foi diagnosticada a mutação G<sub>654</sub>E, com exceção da população 274, em que apenas uma planta mostrou também a mutação S<sub>653</sub>D. Em relação às cinco populações de

médio-alto nível de resistência (MA), 207, 201, 212, 208, e 206, todas as plantas dentro de cada população também apresentaram a mesma mutação encontrada na cultivar resistente IRGA 422 CL. Nestas populações não ocorreram exceções no que se refere à presença de outra mutação que não a G<sub>654</sub>E. Nas populações de arroz vermelho resistentes, 267, 265, 136 e 66, classificadas como tendo baixo nível de resistência (BN), foi encontrada a mutação G<sub>654</sub>E, com exceção de apenas uma planta da população 267 em que foi encontrada a mesma mutação S<sub>653</sub>D, presente na cultivar resistente SATOR CL.

Estes resultados mostram que nas populações de arroz vermelho avaliadas, os níveis de resistência baixo a médio-alto decorrem, em sua maioria, de mecanismo de local de ação alterado, provocado pela mutação G<sub>654</sub>E. Este é o primeiro relato descrito na literatura do diagnóstico da resistência por local de ação alterado em biótipos de arroz vermelho oriundos da região sul do Brasil. Recentemente, a mesma mutação encontrada em IRGA 422 CL, G<sub>654</sub>E, foi identificada em biótipos de arroz vermelho resistente no estado do Arkansas, EUA (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.

A hipótese de que os níveis de resistência estão associados ao tipo de mutação encontrada no arroz vermelho, é confirmada pelos resultados apresentados no presente trabalho. As populações de arroz vermelho classificadas quanto ao nível de resistência em BN e MN possuem predominância da mutação G<sub>654</sub>E. A cultivar IRGA 422 CL foi a menos resistente dentre as cultivares testadas em todos os bioensaios (Figuras 8, 9 e 10). Assim, o nível de resistência diagnosticado nestas populações corroboram com a hipótese de que esta mutação está associada a baixos níveis de resistência.

Outra importante questão a ser discutida refere-se à elevada frequência de ocorrência da mutação G<sub>654</sub>E nas populações de arroz vermelho resistentes. Este fato pode

ser explicado em função da grande utilização da cultivar IRGA 422 CL nas lavouras orizícolas gaúchas, sugerindo desta forma que a provável origem da resistência seja fluxo gênico entre a cultivar IRGA 422 CL e o arroz vermelho.

As populações de arroz vermelho classificadas com alto nível de resistência variaram em relação à mutação encontrada. Por exemplo, na população 32AN, cinco plantas apresentaram a mutação S<sub>653</sub>D e apenas uma a mutação G<sub>654</sub>E. Já na população 235AN todas as plantas apresentaram a mutação S<sub>653</sub>D e em 124AN e 25AN, as plantas possuíam a mutação G<sub>654</sub>E, com exceção de uma planta da população 25 que também apresentou a mutação S<sub>653</sub>D. Na população 135AN, nove das 15 plantas apresentaram a mutação A<sub>122</sub>T e uma planta a mutação G<sub>654</sub>E. Em 66AN foi diagnosticada apenas a mutação G<sub>654</sub>E e na única planta representante da população 90AN não foi encontrada nenhuma das mutações diagnosticadas pelos marcadores SNAPs.

É necessário salientar que a avaliação do nível de resistência foi realizada por população e não por indivíduo, o que pode dificultar o entendimento da importância da mutação no nível de tolerância. Isso explicaria a ocorrência da mesma mutação em indivíduos provenientes de populações com níveis de resistência diferentes. A avaliação da resistência por indivíduo poderá ser obtida em ensaio que extrai o DNA por planta e posteriormente separa essas plantas por mutação, por local de origem e determina curvas dose-resposta para cada conjunto de plantas com mesma mutação. Dessa forma, obtêm-se a importância da mutação no nível de tolerância.

Os resultados obtidos mostram que o elevado nível de resistência em arroz vermelho está associado à presença das mutações A<sub>122</sub>T e S<sub>653</sub>D, corroborando resultados obtidos nos bioensaios de sementes e plântula (Figuras 8 e 9), onde houve maior resistência da cultivar SATOR CL, e no bioensaio de afilhos (Figura 10) em que a cultivar PUITÁ INTA CL foi a cultivar mais resistente.



Em arroz, Rajguru *et al.* (2005) encontraram a mutação S<sub>653</sub>N em híbridos de arroz vermelho resistentes, comprovando que pode ter ocorrido fluxo gênico entre o arroz CL e arroz vermelho. Atualmente quatro espécies de plantas daninhas foram diagnosticadas como resistentes a herbicidas inibidores da ALS por possuírem a mutação Ser<sub>653</sub>, *Amaranthus powellii*, *Amaranthus retroflexus* (McNaughton *et al.*, 2001), *Amaranthus rudis* (Patzoldt *et al.*, 2007) e *Xanthium* sp (Tranel & Wright, 2002).

Em relação à mutação A<sub>122</sub>T, existem cinco espécies de plantas daninhas resistentes, *Amaranthus retroflexus* (McNaughton *et al.*, 2005), *Xanthium strumarium* (Bernasconi *et al.*, 1995), *Amaranthus hybridus* (Hager *et al.*, 1998; Trucco *et al.*, 2006), *Solanum ptycanthum* (Milliman *et al.*, 2000; Milliman *et al.*, 2003) e *Amaranthus powellii* (McNaughton *et al.*, 2005). O elevado número de espécies de plantas daninhas com essas mutações sugere que estas sejam importante fator de seleção para sobrevivência das diferentes espécies sob pressão de seleção gerada pelo herbicida.

## 5 CONCLUSÕES

Dentre os métodos de diagnóstico da resistência aos herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas, a utilização de metodologias expeditas, como por exemplo, embebição de sementes e bioensaios com plântulas e afilhos são técnicas adicionais ao produtor no diagnóstico da resistência. Estes ensaios caracterizam-se por serem de fácil e rápida execução e, principalmente, pelo diagnóstico de discriminação entre indivíduos resistentes e suscetíveis. No bioensaio de afilhos a cultivar PUITÁ INTA CL foi a mais resistente dentre as cultivares resistentes aos herbicidas imidazolinonas testadas. Já nos bioensaios de sementes e plântulas a cultivar SATOR CL foi a mais resistente. As doses discriminatórias para os bioensaios de sementes variaram de 0,001 a 0,1 mM para o comprimento do coleóptilo e de raiz, respectivamente. Nos bioensaios de plântulas e afilhos as doses discriminatórias foram 0,003 e 0,004 M, respectivamente.

A resistência aos herbicidas do grupo das imidazolinonas das cultivares IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL deve-se às mutações G<sub>654</sub>E, S<sub>653</sub>D e A<sub>122</sub>T, respectivamente. O conhecimento da exata sequência nucleotídica que circunda estas mutações permitiu o desenvolvimento de marcadores SNAP.

O uso de marcadores SNAP é viável para diagnóstico do mecanismo de resistência a imidazolinonas em populações de arroz vermelho resistentes. A resistência aos herbicidas inibidores de ALS, presente em populações de arroz vermelho resistentes coletadas como escapes nas lavouras orizícolas do RS nas safras 2006/07 e 2007/08, deve-se à alteração do

local de ação. Há elevada frequência nestas populações da mesma mutação presente na cultivar IRGA 422 CL.

O nível de resistência aos herbicidas imazethapyr + imazapic é dependente da mutação existente no biótipo, sendo que a mutação S<sub>653</sub>D confere maior resistência que a A<sub>122</sub>T e esta maior que G<sub>654</sub>E.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIAS, D.M.; L.H. RIESEBERG. Gene flow between cultivated and wild sunflowers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.89, n.6, p.655-660, 1994.
- ARRIOLA, P.E.; ELLSTRAND, N. C. Fitness of interspecific hybrids in the genus *Sorghum*: Persistence of crop genes in wild populations. **Ecological Applications**, Tempe, v.7, n.2, p.512-518, 1997.
- BECKIE, H. J.; FRIESEN, L. F.; NAWOLSKY, K. E.; MORRISON, I. N. A rapid bioassay to detect trifluralin resistant green foxtail (*Setaria viridis*). **Weed Technology**, Lawrence, v.4, n.3, p.505-508, 1990.
- BECKIE, H. J.; HEAP, I. M.; SMEDA, R. J.; HALL, L. M. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technology**, Lawrence, v.14, n.2, p.428-445, 2000.
- BELLINDER, R.R.; GUMMESSON, G.; KARLSSON, C. Percentage driven government mandates for pesticide reduction: the Swedish model. **Weed Technology**, Lawrence, v.8, n.3, p.350-359, 1994.
- BENITEZ, H.V.R. **Fluxo gênico através da polinização cruzada em arroz irrigado**. 73 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms-583 new estimates. **Annals of Botany**, London, v.80, n.2, p.169-196, 1997.
- BERNASCONI P.; WOODWORTH, A. R.; ROSEN, B. A.; SUBRAMANIAN, M. V.; SIEHL, D. L. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, n.29, p.17381-17385, 1995.
- BOUTSALIS, P. Syngenta quick-test: a rapid whole-plant test for herbicide resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v.15, n. 2, p 257-263, 2001.
- BRAIN, P.; COUSENS, R. An equation to describe dose response where there is stimulation of growth at low doses. **Weed Research**, Oxford, v.29, n.2, p.93-96, 1989.
- BRUNES, T. O.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; MOURA NETO, F.; NEVES, P. C. F.; BRONDANI, C. Fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado estimado por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, 37, n.2, p.86-92, 2007.

BRUNIARD, J. M. **Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of cross-resistance pattern, and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus* L).** *PhD Dissertation*, North Dakota State University, 2001.

BURGOS, N. R.; NORSWORTHY, J. K.; SCOTT, R. C.; SMITH, K. L. Red rice status after five years of Clearfield™ rice. **Weed Technology**, Lawrence, v.22, n.1, p.200-208, 2008.

BURKE, I. C.; THOMAS, W. E.; BURTON, J. D.; SPEARS, J. F.; WILCUT, J. W. A seedling assay to screen aryloxyphenoxypropionic acid and cyclohexanedione resistance in johnsongrass (*Sorghum halepense*). **Weed Technology**, Lawrence, v.20, n.5, p.950-955, 2006.

CHA, R. S.; ZARBL, H.; KEOHAVONG, P.; THILLY, W. G. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. **PCR Methods Applied**, New York, v.2, n.1, p.14-20, 1992.

CHALEFF, R. S.; MAUVAIS, C. J. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. **Science**, New York, v.224, n.4656, p.1443-1445, 1984.

CHEETHAM, D. P. **Outcrossing study between transgenic herbicide-resistant rice and non-transgenic rice in California.** 2004. 91f. Dissertation-University of California, Davis, 2004.

CHO, R. J. *et al.* Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, New York, v.23, n.2, p.203-207, 1999.

CHRISTOPHER, J. T.; POWLES, S. B.; LILJEGREN, D. R.; HOLTUM, J. A. M. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*), II: chlorsulfuron resistance involves a wheat-like detoxification system. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, n.2, p.1036-1043, 1992a.

CHRISTOPHER, J. T.; POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. Resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) involves at least two mechanisms. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, n.4, p.1909-1913, 1992b.

COLWELL, R. K.; NORSE, E. A.; PIMENTEL, D.; SHARPLES, F.E.; SIMBERLOFF, D. Genetic engineering in agriculture. **Science**, New York, v.229, p.111-112, 1985.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em 16 dez. 2008.

CORBETT, C. A. L.; TARDIF, F. J. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. **Pest Management Science**, Sussex, v.62, n.7, p. 584-597, 2006.

COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A uniform, objective and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, Madison, v.40, n.3, p.436-443, 2000.

CROUGHAN, T. P.; UTOMO, H. S.; SANDERS, D. E.; BRAVEMAN, M. P. Herbicide-resistant rice offers potential solution to red rice problem. **Los Angeles Agricultural**, Los Angeles, v.39, p.10-12, 1996.

CROUGHAN, T. P. Arroz resistente a herbicidas imidazolinonas. United States Patent n.5,773,704.0019313, 12 jul 1998, 25 mai 2002.

DÉLYE, C.; MATÉJICEK, A.; GASQUEZ, J. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). **Pest Management Science**, Sussex, v.58, n.5, p. 474-478, 2002a.

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, 2002b.

DIARRA, A.; SMITH, R. J.; TALBERT, R. E. Growth and morphological characteristics of red rice (*Oryza sativa*) biotypes. **Weed Science**, Champaign, v.33, n.3, p.310-314, 1985.

DIEBOLD, R. S.; McNAUGHTON, K. E.; LEE, E. A.; TARDIF, F. J. Multiple resistance to imazethapyr and atrazine in Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science**, Champaign, v.51, n.3, p.312-318, 2003.

DILLON, T. L.; MITTEN, D. H.; RUTGER, N. Gene flow from Clearfiel rice to red rice, In: RICE TECHNICAL WORKING GROUP, 29., Little Rock, 2003. **Proceedings...** Little Rock: RTWG, 2003. p.161

DRENKARD, E.; RICHTER, B. G.; ROZEN, S.; STUTIUS, L. M.; ANGELL, N. A.; MINDRINOS, L.; CHO, R. J.; OEFNER, P. J.; DAVIS, R. W.; AUSUBEL, F. M. A Simple Procedure for the Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms Facilitates Map-Based Cloning in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, n.4, p.1483-1492, 2000.

DUGGLEBY, R.G.; PANG, S.S. Acetohydroxyacid synthase, **Journal of Biochemistry & Molecular Biology**, Singapore, v.33, n.1. p.1-36, 2000.

DUGGLEBY, R. G.; PANG, S. S.; YU, H.; GUDDAT, L. W. Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase: interpretation of herbicide-resistance data. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.270, n.13, p.2895-2904, 2003.

DUGGLEBY, R. G.; McCOURT, J. A.; GUDDAT, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.46, n.3, p.309-324, 2008.

EBI. European Bioinformatics Institute. Programa computacional CLUSTAL W para alinhamento de seqüências nucleotídicas. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Acesso em jan. 2008.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Sistemas de Produção**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em 12 dez. 2008.

ESCORIAL, M. C.; SIXTO, H.; GARCÍA-BAUDÍN, J. M.; CHUECA, M. C. A rapid method to determine cereal plant response to glyphosate. **Weed Technology**, Lawrence, v.15, n.4, p.697-702, 2001.

ESTORNINOS Jr., L. E. *et al.* Simple sequence repeats analysis of hybridization between IMI rice and red rice. In: SOUTHERN WEED SCIENCE SOCIETY ANNUAL MEETING, 56, Houston. **Proceedings**...Houston: SWSS, 2003. p.184

FAO. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/011/ai473e/ai473e04.htm>>. Acesso em 15 jan. 2009.

FISCHER, A. J., RAMIREZ, A. Red rice (*Oryza sativa*): competition studies for management decisions. **International Journal of Pest Management**, London, v.39, n.2, p.133-138, 1993.

FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; GALON, L.; SCHAEGLER, C. E. Competitividade relativa entre cultivares de arroz irrigado e biótipo de arroz-vermelho. **Planta daninha**, Viçosa, v. 26, n.1, p.101-111, 2008.

FLETCHER, J. S.; PFLEEGER, T.G.; RATSCH, H.C. Potential environmental risks associated with the new sulfonylurea herbicides. **Environmental Science Technology**, Washington, v.27, n.10, p.2250-2252, 1993.

FONTANA, L. C.; AGOSTINETTO, D.; PINTO, J. J. O.; RIGOLI, R. P.; FIGUEREDO, S. S.; ROSENTHAL, M. D. Tolerância de cultivares de arroz irrigado (*Oryza sativa*), ao herbicida nicosulfuron e à mistura formulada de imazethapyr + imazapic. **Planta Daninha**, Viçosa, v.25, n.4, p.791-798, 2007.

GAZZIERO, D. L. P.; BRIGHENTI, A. M.; MACIEL, C. D. G.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; ADEGAS, F. S.; VOLL, E. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, Viçosa, v.16, n.2, p.117-125, 1998.

GAZZIERO, D. L. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; BRIGHENTI, A. M.; PRETE, C. E. C.; VOLL, E. Resistência da planta daninha capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) aos herbicidas inibidores da ACCase na cultura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v.18, n.1, p.169-180, 2000.

GEALY, D. R.; TAI, T. H.; SNELLER, C. H. Identification of red rice, rice, and hybrid populations using microsatellite markers. **Weed Science**, Champaign, v.50, n.3, p.333-339, 2002.

GEALY, D. R.; MITTEN, D. H.; RUTGER, J. N. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. sativa*): implications for weed management. **Weed Technology**, Lawrence, v.17, n.3, p.627-645, 2003.

GERWICK, B. C.; SUBRAMANIAN, M. V.; LONEY-GALLANT, V. I. Mechanism of action of the 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidines. **Pesticide Science**, Oxford, v.29, n.3, p.357-364, 1990.

HALL, L. M.; STROME, K. M.; HORSMAN, G. P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, Champaign, v.46, n.4, p.390-396, 1998.

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.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em : 28 abr. 2008.

HEAP, I. (2009) International Survey of Herbicide-resistant Weeds. Disponível em: <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em 12 fev. 2009.

HEAP, I.M.; TRANEL, P.J.; WRIGHT, T.R. **ALS mutations from herbicide-resistant weeds**. Disponível em: < <http://www.weedscience.org/mutations/MutDisplay.aspx>>. Acesso em : 24 abr. 2009.

HAGER, A. G.; WAX, L. M.; TRANEL, P. J. Identification of a smooth pigweed biotype in Illinois resistant to various ALS-inhibiting herbicides. **Proceedings of the North Central Weed Science Society**, Champaign, v.53, p.81, 1998.

HALL, T. (1997) Programa computacional BIOEDIT Versão 7.0.9 para edição de seqüências nucleotídicas. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Acesso em mar. 2007.

HAMAMURA, K.; MURAOKA, T.; HASHIMOTO, J.; TSURUYA, A.; TAKAHASHI, H.; TAKESHITA, T.; NOTITAKE, K. Identification of sulfonylurea-resistant biotypes of paddy field weeds using a novel method based on their rooting responses. **Weed Biology and Management**, Kyoto, v.3, n.4, p.242-246, 2003.

IRGA. Plantio da safra 2008/09 evolui na época de semeadura. **Revista Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v. 56, n. 446, p.34-40, 2008.

IRGA. **Arroz irrigado no RS – área, produção e rendimento**. Disponível em: < <http://www.irga.rs.gov.br>>. Acesso em set. 2008.

IRGA. **Características da cultivar IRGA 417**. Disponível em: < [http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action=novidades\\_detalhe&id=16](http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action=novidades_detalhe&id=16)>. Acesso em 6 jan. 2009.

IZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. **Trends Plant Science**, Oxford, v.1, n.3, p.95-99, 1996.

KADARU, S.; ZHANG, W.; YADAV, A.; OARD, J. H. Development and application of allele-specific PCR assays for imazethapyr resistance in rice (*Oryza sativa*). **Euphytica**, Wageningen, v.160, n.3, p.431-438, 2008.

KALSING, A.; GOULART, I. C. G. R.; VIDAL, R. A. **Método rápido para a diagnose da resistência das ervas aos herbicidas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. [Folder].



KENNEDY, G. *et al.* Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. **International Rice Commission Newsletter**, Rome, v.51, p.33-42, 2002.

KIM, D. S.; RICHES, C. R.; VALVERDE, B. E. Rapid detection of propanil and fenoxaprop resistance in *Echinochloa colona*. **Weed Science**, Champaign, v.48, n.6, p.695-700, 2000.

KNIAS. **Kikuchi National Institute of Agrobiological Sciences**. Division of Genome and Biodiversity Research. Disponível em: <[http://www.nias.affrc.go.jp/index\\_e.html](http://www.nias.affrc.go.jp/index_e.html)>. Acesso em: jan. 2009.

KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotypespecific PCR-based markers. **The Plant Journal**, Gainesville, v.4, n.2, p.403-410, 1993.

KUMARI, S.; PANJABI, V.; SINGLA-PAREEK, S. L.; SOPORY, S. K.; PAREEK, A. A comparative transcriptome map of early and late salinity stress responses in contrasting genotypes of *Oryza sativa* L. **Stress Physiology and Molecular Biology Laboratory**, New Delhi, 2007.

KUK, Y. I.; JUNG, H. I.; KWON, O. D.; LEE, D. J.; BURGOS, N. R.; GUH, J. O. Rapid diagnosis of resistance to sulfonylurea herbicides in monochoria (*Monochoria vaginalis*). **Weed Science**, Champaign, v.51, n.3, p.305-311, 2003.

KUK, Y. I.; BURGOS, N. R.; SHIVRAIN, V. K. Natural tolerance to imazethapyr in red rice (*Oryza sativa*). **Weed Science**, Champaign, v.56, n.1, p.1-11, 2008.

KWOK, S.; KELLOGG, D. E.; MCKINNEY, N.; SPASIC, D.; GODA, L.; LEVENSON, C.; SNINSKY, J. J. Effects of primertemplate mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.18, n.4, p.999-1005, 1990.

KWOK, S.; CHANG, S. Y.; SNINSKY, J. J.; WANG, A. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. **PCR Methods Applied**, New York, v.3, n.1, p.39-47, 1994.

LAMEGO, F. P. **Elucidação do mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS na espécie poliplóide *Bidens subalternans* DC.** 2008. 152 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LANGEVIN, S. A.; CLAY, K.; GRACE, J. B. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). **Evolution**, Lancaster, v.44, n.4, p.1000-1008, 1990.

LEE, Y.; CHANG, A. K.; DUGGLEBY, R. G. Effect of mutagenesis at serine 653 of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase on the sensitivity to imidazolinone and sulfonylurea herbicides. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.452, n.3, p.341-345, 1999.

LEVY, R. J.; BOND, J. A.; WEBSTER, E. P.; GRIFFIN, J. L.; ZHANG, W. P.; LINScombe, S. D. Imidazolinone-tolerant rice response to imazethapyr application. **Weed Technology**, Lawrence, v.30, n.3, p.389-393, 2006.

LIVORE, A. B. **Rice plants having increased tolerance to imidazolinone herbicides**. International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT), n.WO2005/020673A1. 29 ago 2003, 10 mar 2005.

LOPES, M. C. B. *et al.* **IRGA 422 CL a cultivar desenvolvida para o sistema de produção clearfield arroz**. Instituto Rio Grandense do Arroz – IRGA. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br/arquivos/20071107163254.pdf>>. Acesso 15 mar. 2009.

MALLORY-SMITH, C.A.; HENDRICKSON, P.; MUELLER-WARRANT, G.W. Identification of herbicide resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, Lawrence, v.4, n.1, p.163-168, 1990.

MAGALHÃES Jr., A. M. et al. Avaliação do fluxo gênico entre arroz transgênico, cultivado e arroz-vermelho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, v.24, 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOSBAI, 2001. p. 768-771

MAZUR, B. J.; CHUI, C. F.; SMITH, J. K. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v.85, n.4, p.1110-1117, 1987.

MAZRU, B. J.; FALCO, S. C. The development of herbicide resistant crops. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.40, p.441-470, 1989.

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.

MEROTTO JR., A.; JASIENIUK, M.; OSUNA, M. D.; VIDOTTO, F.; FERRERO, A.; FISCHER, A. J. Cross-resistance to herbicides of five ALS-inhibiting groups and sequencing of the ALS gene in *Cyperus difformis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, n.4, p.1389-1398, 2009.

McCOURT, J. A.; PANG, S. S.; SCOTT, J. K.; GUDATT, L. W.; DUGLEBY, R. G. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Eugene, v. 17, n.3, p.569-573, 2006.

McNAUGHTON, K. E.; LEE, E. A., TARDIF, F. J. Mutations in the ALS gene conferring resistance to group II herbicides in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and green pigweed (*A. powellii*). **Weed Science Society of America Abstracts**, Champaign, v.41, p.97, 2001.

McNAUGHTON, K. E.; LETARTE, J.; LEE, E. A.; TARDIF, F. J. Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science**, Champaign, v.53, n.1, p.17-22, 2005.

MICHAELS, S. D.; AMASINO, R. M. A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. **The Plant Journal**, Gainesville, v.14, n.3, p.381-385, 1998.

MICHAEL, J. C.; VIJAY, K. N.; KIRK, A. H.; TODD, R. W. Target-site resistance to acetolactate synthase in wild mustard (*Sinapis arvensis*). **Weed Science**, Champaign, v.54, n.2, n.1, p.191-197, 2006.

MILLIMAN, L. D.; RIECHERS, D.E.; SIMMONS, F. W.; WAX, L. M. Two biotypes of eastern black nightshade that are resistant to ALS-inhibiting herbicides. **Proceedings of the North Central Weed Science Society**, Champaign, v.55, p.86, 2000.

MILLIMAN, L. D.; RIECHERS, D. E.; WAX, L. M.; SIMMONS, F. W. Characterization of two biotypes of imidazolinone-resistant eastern black nightshade (*Solanum ptycanthum*). **Weed Science**, Lawrence, v.51, n.2, p.139-144, 2003.

NEFF, M. M.; NEFF, J. D.; CHORY, J.; PEPPER, A. E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. **The Plant Journal**, Gainesville, v.14, n.3, p.387-392, 1998.

NEWHOUSE, K.; WANG, T.; ANDERSON, P. **Imidazolinone tolerant crops**. In: SHANER, D. L.; O'CONNOR, S. L. (ed.) *The imidazolinone herbicides*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.139-150.

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, L. E.; POWELL, S. J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N.; SMITH, J. C.; MARKHAM, A. F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v17, n.7, p.2503-2516, 1989.

NIAS. National Institute of Agrobiological Sciences Rice Full-Length cDNA Project team. **Science**, New York, v.301, p.376-379, 2003.

NOLDIN, J. A.; CHANDLER, J. M.; McCAULEY, G. N. Red rice (*Oryza sativa*) biology. I. Characterization of red rice ecotypes. **Weed Technology**, Lawrence, v.13, n.1, p.12-18, 1999.

NOLDIN, J. A.; YOKOYAMA, S.; STUKER, H.; RAMPELOTTI, F.T.; GONÇALVES, M. I. F.; EBERHARDT, D. S.; ABREU, A.; ANTUNES, P.; VIEIRA, J. Desempenho de populações híbridas F2 de arroz-vermelho (*Oryza sativa*) com arroz transgênico (*O. sativa*) resistente ao herbicida amônio-glufosinate. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.3, p.381-395, 2004.

NORSWORTHY, J. K.; BURGOS, N. R.; SCOTT, R. C.; SMITH, K. L. Consultant perspectives on weed management needs in Arkansas rice. **Weed Technology**, Lawrence, v.21, n.3, p.832-839, 2007.

OHYANAGI, H.; TANAKA, T.; SAKAI, H.; SHIGEMOTO, Y.; YAMAGUCHI, K.; HABARA, T.; FUJII, Y.; ANTONIO, B.A.; NAGAMURA, Y.; IMANISHI, T.; IKEO, K.; ITOH, T.; GOJOBORI, T.; SASAKI, T. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB):

hub for *Oryza sativa* ssp. japonica genome information. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.34, p.741-744, 2006.

PANG, S.S.; DUGGLEBY, R. G.; GUDDAT, L. W. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, London, v.317, n.2, p.249-262, 2002.

PANG, S.S.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, n.9, p.7639-7644, 2003.

PANG, S. S.; DUGGLEBY, R. G.; SCHOWEN, R. L.; GUDDAT, L. W. The crystal structures of *Klebsiella pneumoniae* acetolactate synthase with enzymebound cofactor and with an unusual intermediate. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v.279, n.3, p.2242-2253, 2004.

PARK, K.W.; MALLORY-SMITH, C. A.; BALL, D. A.; MUELLER-WARRANT, G. W. **Partial sequence of downy brome acetolactate synthase**. Unpublished Submitted to GeneBank Accession Number. Department of Crop and Soil Science, Oregon State, 2002.

PARK, K.W.; MALLORY-SMITH, C.A. Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. **Weed Research**, Oxford, v.44, n.2, p.71-77, 2004.

PATERSON, A. H.; SCHERTZ, K. F.; LIN, Y. R.; LIU, S. C.; CHANG, Y. L. The weediness of wild plants: molecular analysis of genes influencing dispersal and persistence of johnsongrass, *Sorghum halepense* (L.) Pers. **Proceedings National Academy of Science USA**, v.92, p.6127-6131, 1995.

PATZOLDT, W. L.; Tranel, P. J. ALS mutations conferring herbicide resistance in waterhemp. **Proceedings of the North Central Weed Science Society**, Champaign, v.56, p.67, 2001.

PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J. Multiple ALS mutations confer herbicide resistance in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, Champaign, v.55, n.5, p.421-428, 2007.

PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Research**, Oxford, v.43, n.1, p.12-19, 2003.

PETRUSKA, J.; GOODMAN, M. F.; BOOSALIS, M. S.; SOWERS, S. C.; CHEONG, C; TINOCO JR., I. Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Eugene , v.85, n.17, p.6252-6256, 1988.

PORTES, E. S. *Eleusine indica* (L.) Gaertn. resistente a alguns inibidores de ACCase e novo método para diagnóstico de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

- POWLES, S. B.; SHANER, D. L. **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.308.
- PRIMIANI, M.; COTTERMAN, M. J. C.; SAARI, L. L. Resistance of kochia (*Kochia scoparia*) to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. **Weed Technology**, Lawrence, v.4, n.1, p.169-172, 1990.
- PRIMO PRO 3.4 PCR *PRIMER DESIGN*. Software. Disponível em: <<http://www.changbioscience.com/primo/primo.html>>. Acesso em set. 2007.
- PRESTON, C.; STONE, L. M.; RIEGER, M. A.; BAKER, J. Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactato synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.84, n.3, p.227-235, 2006.
- RAJGURU, S. N.; BURGOS, N. R.; STEWART, J. M.; GEALY, D. Genetic diversity in red rice using SSR markers. **Proceedings of the North Central Weed Science Society**, Champaign, v.55, p.115-116, 2002.
- RAJGURU, S. N.; BURGOS, N.; SHIVRAIN, V. K.; STEWART, J. M. Mutations in the red-rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. **Weed Science**, Champaign, v.53, n.5, p.567-577, 2005.
- RASBAND, W. S. **ImageJ Software**. U.S. National Institutes of Health, Ethesda, MD. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>> Acesso em jan.1997.
- READE, J. P. H.; COBB, A. H. Herbicides: modes of action and metabolism. In: NAYLOR REL (ed). **Weed management handbook**. Blackwell Science, Oxford, 2002. p.134-170.
- RITALA, A.; NUUTILA, A. M.; AIKASALO, R.; KAUPPINEN, V.; TAMMISOLA, J. Measuring gene flow in the cultivation of transgenic barley. **Crop Science**, Madison, v.42, n.1, p.278-285, 2002.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. E. Bioassays using R. **Journal of Statistical Software**, Washington, v.12, n.5, p.1-22, 2005.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. C.; CEDERGREEN, N. Statistical assessment of dose-response curves with free software Collection of examples. **Department of Natural Sciences**, Denmark, p.256, 2006.
- ROBERTS, E. H.; CRAWFORD, R. Q.; COCHET, F. Estimation of percentage of natural crosspollination: experiment on rice. **Nature**, London, v.190, n.4781, p.1084-1085, 1961.
- RUIZ-SANTAELLA, J. P. *et al.* **Detection of a new mutation of glycine to serine in the ACCase of a resistant biotype of *Phalaris paradoxa***. In: Annual Meeting of the Weed Science Society of America, New York, 2006. Abstracts... New York: WSSA, 2006, v.46, p.345-351.

SAARI, L. L.; COTTERMAN, J.C.; THILL, D.C. **Resistance to acetolactato synthase-inhibiting herbicides.** In: *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p.83-139.

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.

SANTEL, H. J.; BOWDEN, B. A.; SORENSEN, V. M.; MUELLER, K. H.; REYNOLDS, J. Flucarbazone-sodium: a new herbicide for grass control in wheat. **Weed Science Society of America Abstracts**, Champaign, v.39, p.7, 1999.

SATHASIVAN, K.; HAUGHN, G.W.; MURAI, N. Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.8, p.2188, 1990.

SCHWANKE, A. M. L.; ANDRES, A.; NOLDIN, J. A.; CONCENÇO, G.; PROCÓPIO, S. O. Avaliação de germinação e dormência de ecótipos de arroz-vermelho. **Planta daninha**, Viçosa, v.26, n.3, p.497-505, 2008.

SEEFELDT, S. S.; ZEMETRA, R.; YOUNG, F. L.; JONES, S. S. Production of herbicide-resistant jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) 3 wheat (*Triticum aestivum*) hybrids in the field by natural hybridization. **Weed Science**, Champaign, v.46, p.632-634, 1998.

SHANER, D. L.; ANDERSON, P. C.; STIDHAM, M.A. Imidazolinones: potential inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology**, Rockville, v.76, n.2, p.545-546, 1984.

SHANER, D. L.; BASCOMB, N. F.; SMITH, W. **Imidazolinone resistant crops: selection, characterization and management.** In: DUKE, S. O. (ed.) *Herbicide resistant crops*. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.143-157.

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.

SHIMIZU, T.; NAKAYAMA, I.; NAGAYAMA, K.; FUKUDA, A.; TANAKA, Y. Life Science Research Institute, Kumiai Chemical Industry Co., Ltd., **Biotechnology Research Group**, Japan, 2000.

SHIVRAIN, V. K.; BURGOS, N. R.; MOLDENHAUER, K. A. K.; MCNEW, R. W.; BALDWIN, T. L. Characterization of spontaneous crosses between Clearfield rice (*Oryza sativa*) and Red rice (*Oryza sativa*). **Weed Technology**, Lawrence, v.20, n.3, p.576-584, 2006.

SHIVRAIN, S. V.; BURGOS, N. R.; ANDERS, M. M.; RAJGURU, S. N.; MOORE, J.; SALES, M.A. Gene flow between Clearfield<sup>TM</sup> rice and red rice. **Crop Protection**, Guildford, v.26, n.3, p.349-356, 2007.

SINGH, R. J.; KHUSH, G. S. **Cytogenetics of rice**. In: NANDA, J. S. (ed.) Rice Breeding and Genetics - Research Priorities and Challenges. Enfield: NH/Science Publishers, 2000. p.287-311.

SITCH, L. A. **Incompatibility barriers operating in crosses of *Oryza sativa* with related species and genera**. In: GUSTAFSON, J. P. (ed.) Gene Manipulation in Plant Improvement. 2 ed. New York: Plenum Press, 1990. p.77-93.

SOMMER, S. S.; CASSADY, J. D.; SOBELL, J. L.; BOTTEMA, C. D. A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. **Mayo Clinical Proceedings**, Rochester, v.68, p.1361-1372, 1989.

SOSBAI. Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: **Manual de Recomendações Técnicas**. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO E XXVII REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 5., 2007, Pelotas, RS. Anais...Pelotas:CBAI, p.154, 2007.

STIDHAM, M. A. Herbicides that inhibit acetohydroxyacid synthase. **Weed Science**, Champaign, v.39, n.4, p.428-434, 1991.

STREIBIG, J. C.; RUDEMO, M.; JENSEN, J. E. **Dose response curves and statistical models**. In: KUDSK, P.; STREIBIG, J. E. (ed.) Herbicide Bioassays. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.29-55.

TAN, S.; EVANS, R. R.; DAHMER, M. L.; SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, Sussex, v.61, n.3, p.246-257, 2005.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide tolerant crops. **Amino Acids**, Wien, v.30, n. 2, p.195-204, 2006.

TAL, A.; KOTOULA-SYKA, E.; RUBIN, B. Seed-bioassay to direct grass weeds resistant to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. **Crop Protection**, Guildford, v.19, n.7, p.467-472, 2000.

TRANDEL, P.J.; WRIGHT, T.R. Resistance of weeds to ALS inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Champaign, v.50, n.6, p.700-712, 2002.

TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; KRUSE, N. D.; NUNES, A. L. Bioensaios para identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla a inibidores da ALS e da PROTOX. **Planta Daninha**, Viçosa, v.24, n.3, p.563-571, 2006.

TRUCCO, F.; HAGER, A. G.; TRANDEL, P. J. Acetolactate synthase mutation conferring imidazolinone-specific herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.163, n.4, p.475-479, 2006.

UGOZZOLI, L.; WALLACE, R. B. Allele-specific polymerase chain reaction. **Methods Enzymol.**, New York, v.2, n.1, p.42-48, 1991.

VAUGHAN, L. K.; OTTIS, B. V.; PRAZAK-HAVEY, A. M.; SNELLER, C.; CHANDLER, J. M.; PARK, W. D. Is all red rice found in commercial rice really *Oryza sativa*? **Weed Science**, Champaign, v.9, n.4, p.468-479, 2001.

VELDHUIS, L. J.; HALL, L. M.; O'DONOVAN, J. T.; DYER, W.; HALL, J. C. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.48, n.7, p.2986-2990, 2000.

VILLA, S. C. C.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A.; MASSONI, P. F. S.; TELO, G. M.; MACHADO, S. L. O.; CAMARGO, E. R. Arroz tolerante a imidazolinonas: controle do arroz vermelho, fluxo gênico e efeito residual do herbicida em culturas sucessoras não-tolerante. **Planta Daninha**, Viçosa, v.24, n.4, p.761-768, 2006.

VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. 152p. 2001.

VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M. Desenvolvimento comparativo entre biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.5, n.1, p.122-126, 1999.

WANGKUMHANG, P.; CHAICHOOMPU, K.; NGAMPHIW, C.; RUANGRIT, U.; CHANPRASERT, J.; ASSAWAMAKIN, A.; TONGSIMA, S. Wasp: a web-based allele-specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. **BMC Genomics**, London, v.8, n.1, p.275-283, 2007.

WARWICK, S. I.; XU, R.; SAUDER, C.; BECKIE H. J. Acetolactate synthase target-site mutations and single nucleotide polymorphism genotyping in ALS-resistant kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, Champaign, v.56, n.6, p.797-806, 2008.

WEBSTER, T. M. The southern states 10 most common and troublesome weeds in rice. Proceedings Southern Weed Science Society, Champaign, v.53, n.3, p.247-274, 2000.

WEBSTER, E. P.; MASSON, J. A. Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. **Weed Science**, Champaign, v.49, n.5, p.652-657, 2001.

WHALEY, C. M.; WILSON, H. P.; WESTWOOD, J. H. ALS resistance in several smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) biotypes. **Weed Science**, Champaign, v.54, n.5, p.828-832, 2006.

WHALEY, C. M.; WILSON, H. P.; WESTWOOD, J. H. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Champaign, v.55, n.2, p.83-90, 2007.

WRIGHT, T. R.; BASCOMB, N. F.; STURNER, S. F.; PENNER, D. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. **Weed Science**, Champaign, v.46, n.1, p.13-23, 1998.

WU, D. Y.; UGOZZOLI, L.; PAL, B. K.; WALLACE, R.B. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia.



**Proceedings National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.86, p.2757-2760, 1989.

YU, Q.; ZHANG, X. Q.; HASHEM, A.; WALSH, M. J.; POWLES, S. B. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. **Weed Science**, Champaign, v.51, n.6, p.831-838, 2003.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, New Rochelle, NY, v.7, n.1-2, p.203-214, 2000.

ZHANG, W. **Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide resistance from clearfield rice to red rice**. 2006. 146f. Dissertation-Louisiana State University and agricultural & Mechanical College, Louisiana, 2006.

ZHOU, Q.; LIU, W.; ZHANG, Y.; LIU, K. K. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.89, n.2, p.89-96, 2007.

ZHU, C. (2002) Programa computacional Primo PRO 3.4 PCR Primer Design. Programas de bioinformática disponível no site CHANG BIOSCIENCE. Disponível em: <http://www.changbioscience.com/primo/primo.html> Acesso em set. 2007.

## 7 VITA

Ana Carolina Roso é filha de Sergio Luís Roso e Neiva Regina Roso. Nasceu em Porto Alegre – RS, em 02 de dezembro de 1982. Coursou o primeiro grau no Colégio Marista Roque Gonçalves e no Colégio Estadual Borges de Medeiros em Cachoeira do Sul – RS. Completou o segundo grau na Escola Estadual de 1º e 2º Graus Alberto Jackson Byington Junior em Maringá-PR. Em 2002 ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR, onde se graduou Engenheira Agrônoma em 2007. No mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).