

BIOENSAIOS PARA DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS IMIDAZOLINONAS EM ARROZ¹

Bioassays for Diagnosis of Resistance to the Herbicides Imidazolinones in Rice Plants

ROSO, A.C.², MEROTTO JR., A.³ e DELATORRE, C.A.⁴

RESUMO - Cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas têm proporcionado a utilização destes para o controle do arroz-vermelho, que é um dos principais problemas da cultura do arroz irrigado. No entanto, biótipos de arroz-vermelho resistentes aos herbicidas imidazolinonas têm ocorrido em várias lavouras dessa cultura. O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos expeditos para a identificação de plantas de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas em diferentes fases do desenvolvimento da planta. Foram utilizados os cultivares de arroz IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL como padrão resistente aos herbicidas imidazolinonas, e o cultivar IRGA 417, como padrão suscetível. Os bioensaios realizados em sementes, plântulas e afilhos discriminaram de forma efetiva e rápida plantas de arroz resistentes e suscetíveis. As concentrações discriminadoras aos herbicidas imazethapyr + imazapic para os bioensaios de sementes, plântulas e afilhos foram de 0,01, 4 e 3 mM, respectivamente. A utilização desses bioensaios permite a identificação de indivíduos resistentes mesmo durante o desenvolvimento da lavoura, proporcionando assim a adoção de medidas que possam manter a sustentabilidade do controle de arroz-vermelho por meio de cultivares resistentes aos herbicidas.

Palavras-chave: arroz irrigado, imazethapyr, imazapic, arroz-vermelho.

ABSTRACT - Red rice is the most troublesome weed in rice paddy fields. Herbicide resistant rice cultivars allow red rice control through the herbicides imidazolinones. However, imidazolinone resistant red rice biotypes have occurred in several rice paddy fields. The aim of this study was to develop rapid methods to identify imidazolinone resistant rice plants at different stages of rice plant development. The rice cultivars IRGA 422 CL, SATOR CL and PUITÁ INTA CL were used as well-known resistant cultivars, and IRGA 417 as a well-known susceptible check. The seed, seedling, and tiller bioassays discriminated resistant and susceptible plants efficiently, being considered fast methods for herbicide resistance diagnosis in rice. The discriminatory concentrations between resistant and susceptible plants to the herbicides imazethapyr + imazapic for the seed, seedling and tiller bioassays were 0.01 mM, 4 mM and 3 mM, respectively. The use of these bioassays allows the identification of resistant individuals even during the rice crop season, and can be used to indicate the need of alternative measures to maintain the sustainability of red rice control in fields cultivated with herbicide resistance cultivars.

Keywords: flooded rice, imazethapyr, imazapic, red rice.

INTRODUÇÃO

A cultura do arroz irrigado produziu um rendimento de grãos médio de 7 t ha⁻¹ no Estado do Rio Grande do Sul (IRGA, 2008). No entanto,

diversos fatores, como manejo inadequado da cultura, uso de sementes não certificadas e, principalmente, controle insatisfatório de plantas daninhas, ainda limitam o incremento do rendimento de grãos. Desses fatores, a

¹ Recebido para publicação em 29.6.2009 e na forma revisada em 15.6.2010.

² Eng^a-Agr^a, M.Sc., Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Caixa Postal 776, 91501-970 Porto Alegre-RS, <roso_ac@yahoo.com.br>; ³ Eng^a-Agr^a, Ph.D., Professor da Faculdade de Agronomia, UFRGS, <merotto@ufrgs.br>; ⁴ Eng^a-Agr^a, Ph.D., Professora da Faculdade de Agronomia, UFRGS, <cadtorre@ufrgs.br>.



elevada incidência de arroz-vermelho destaca-se como fator mais limitante ao potencial produtivo do arroz na maioria das regiões do mundo (Webster, 2000; Burgos et al., 2008) e no Brasil (Noldin et al., 2004). O controle de arroz-vermelho por meio de herbicidas seletivos é dificultado pelo fato de o arroz cultivado e o arroz-vermelho pertencerem à mesma espécie. Ainda, o controle de arroz-vermelho por outros métodos possui eficiência limitada, sobretudo em grandes áreas de cultivo.

O desenvolvimento de cultivares de arroz resistentes a imidazolinonas ocorreu a partir de sementes de arroz da linhagem AS3510 que foram mutagenizadas com etilmetanossulfonato (EMS) (Croughan, 1998). Esta linhagem, denominada 93AS3510, originou os primeiros cultivares resistentes a imidazolinonas comercializados nos EUA no ano de 2001 (Webster & Masson, 2001). Esses cultivares permitem a utilização dos herbicidas imidazolinonas para o controle de diversas plantas daninhas na cultura do arroz, inclusive o arroz-vermelho. No Brasil, o cultivar de arroz resistente aos herbicidas imidazolinonas IRGA 422 CL foi desenvolvido pela seleção de retrocruzamento, utilizando-se a linhagem 93AS3510 como fonte doadora do gene que confere tolerância ao herbicida e o cultivar IRGA 417 como cultivar recorrente (Lopes et al., 2002). Ainda, os cultivares SATOR CL, AVAXI CL, XP710 CL e SCS 115 CL (SOSBAI, 2007) e o cultivar PUITA INTA CL, recentemente introduzido da Argentina, também são resistentes aos herbicidas imidazolinonas e diferenciam-se entre si em relação à mutação do gene ALS (Livore et al., 2003; Rajguru et al., 2005; Tan et al., 2005), bem como em relação a características agronômicas (SOSBAI, 2007).

A introdução de cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas permitiu o controle seletivo do arroz-vermelho. No entanto, apesar de representar um grande benefício para a cultura do arroz, a utilização desse método de controle pode apresentar limitações, principalmente relacionadas ao surgimento de arroz-vermelho resistente aos herbicidas. Diversos fatores podem contribuir para o surgimento dessa resistência, como alta frequência de uso de cultivares resistentes aos herbicidas, elevada densidade de infestação dessa planta daninha, efeito residual dos

herbicidas e uso de sementes não certificadas (Villa et al., 2006). Em estudo de monitoramento da ocorrência de arroz-vermelho resistente aos herbicidas do grupo das imidazolinonas realizados em 228 lavouras do Estado do RS, constatou-se que 127 delas (55,7%) apresentaram indivíduos resistentes aos herbicidas imazethapyr + imazapic (Menezes et al., 2009). Em decorrência da elevada frequência de surgimento de plantas de arroz-vermelho resistentes a imidazolinonas, há necessidade do desenvolvimento de métodos expeditos para proporcionar correta e rápida identificação de indivíduos resistentes, visando à identificação precisa das áreas onde essa ferramenta de controle é ineficaz em razão da presença de arroz-vermelho resistente aos herbicidas.

O diagnóstico de plantas daninhas resistentes em uma lavoura é essencial para nortear modificações no seu manejo, e este deve ser inequívoco e rápido, permitindo maior agilidade e eficiência das medidas a serem implantadas (Beckie et al., 2000). Experimentos clássicos de identificação da resistência demandam muito tempo e espaço para sua execução, sendo onerosos e não expeditos e, por isso, inadequados para análise de um grande número de amostras (Vidal et al., 2006). Assim, abordagens mais expeditas são necessárias para identificação de biótipos resistentes. Dessa forma, bioensaios com sementes, com órgãos da própria planta sob suspeita e com a enzima-alvo, entre outros, podem ser utilizados para identificação de indivíduos resistentes aos herbicidas (Beckie et al., 1990, 2000; Merotto Jr. et al., 2009). Em bioensaios de germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e PROTOX, onde elas 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). No entanto, a utilização de bioensaios demanda a determinação das condições que proporcionem a correta discriminação entre indivíduos resistentes e suscetíveis, que podem variar conforme as condições de crescimento das plantas, do herbicida e da espécie a ser avaliada.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos expeditos para identificação de

plantas de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas em diferentes fases do desenvolvimento da planta, a fim de proporcionar o monitoramento de arroz-vermelho resistente aos herbicidas em lavouras de arroz irrigado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos bioensaios em três estádios de desenvolvimento do ciclo do arroz: sementes, plântulas e afilhos. O herbicida utilizado nesses bioensaios foi a mistura comercial dos herbicidas imazethapyr (75 g i.a. L⁻¹) + imazapic (25 g i.a. L⁻¹) (Only®), que pertencem ao grupo químico das imidazolinonas. Esse herbicida foi escolhido por ser o produto recomendado para os cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas. Os materiais vegetais utilizados nos experimentos foram os cultivares de arroz IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL, sendo estes considerados resistentes ao herbicida, e o cultivar IRGA 417, suscetível. Esses cultivares de arroz foram usados 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 em que se utilizaram plantas, estas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos plásticos com capacidade para 5 L. Os vasos foram mantidos sob uma lâmina de água de aproximadamente 5 cm acima da superfície do solo.

I Bioensaio de embebição de sementes

Este bioensaio foi realizado com base em dois experimentos. Em ambos, foram determinadas curvas de dose-resposta de sementes de arroz submetidas às seguintes concentrações do herbicida: 0; 0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; e 100 mM, definidas a partir de experimentos preliminares baseados em estudos semelhantes (Kuk et al., 2003). 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 (dois cultivares x nove concentrações), sendo o fator A os cultivares IRGA 422 CL e IRGA 417 e o fator B, as nove

concentrações do herbicida anteriormente descritas, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por 50 sementes. Inicialmente, as sementes foram embebidas por 24 horas nas soluções de cada tratamento dos herbicidas. Posteriormente, elas foram dispostas em papel para germinação, o qual foi enrolado e colocado em sala de crescimento na temperatura de 25 °C ± 1 °C, com iluminação constante. O comprimento do coleóptilo e a porcentagem de germinação foram determinados aos sete dias após a transferência das sementes para o papel germinador. Nesse 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 para porcentagem da testemunha não tratada.

O segundo experimento foi realizado para determinar as curvas de dose-resposta, utilizando o parâmetro comprimento de raiz seminal como variável-resposta. O experimento foi conduzido de forma semelhante ao descrito anteriormente, porém avaliando os quatro cultivares mencionados inicialmente. O comprimento das raízes seminais foi avaliado aos sete dias após embebição nos tratamentos. Nesse momento, cada repetição foi fotografada com resolução de um megapixel, em fundo preto. O comprimento de raízes foi obtido pelo programa IMAGE J (Rasband, 1997). Os dados foram transformados para porcentagem da testemunha não tratada.

A análise dos dados experimentais foi realizada através do aplicativo “drc” do programa “R” (Ritz et al., 2005), pelo ajuste da equação logística de três parâmetros, em que $f(x)$ representa o parâmetro a ser estimado; d , o limite superior da curva; b , 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. O fator de resistência (FR) foi obtido pela relação do GR50 entre o cultivar resistente e o suscetível. Nos bioensaios de embebição de sementes em que se avaliaram 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. O intervalo de confiança (IC 95%) foi obtido visando determinar a significância entre o GR50 obtido e o do fator de resistência (FR).

II Bioensaio de plântulas

As especificações para este bioensaio foram obtidas conforme a metodologia utilizada para a determinação da resistência a sulfonilureias na espécie *Monochoria vaginalis* (Kuk et al., 2003). As sementes foram germinadas em papel de germinação em temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com iluminação constante. Cinco dias após a germinação das sementes, quando elas atingiram o estágio de plântula, com três folhas visivelmente desenvolvidas, as raízes foram removidas e as plântulas 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 (quatro cultivares x sete concentrações), com quatro repetições. Cada unidade experimental constou de um copo plástico com capacidade de 50 mL, contendo duas plântulas, que recebeu 25 mL da solução herbicida de cada tratamento. As unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento em temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com iluminação constante. O comprimento de raízes principais novas foi avaliado aos sete dias após a transferência das plântulas para os respectivos tratamentos. O comprimento de raízes principais foi avaliado de forma semelhante à descrita anteriormente. Os dados obtidos foram transformados para porcentagem da testemunha não tratada.

III Bioensaio de afilhos

A metodologia utilizada neste bioensaio foi adaptada a partir de estudos semelhantes para detecção de resistência aos herbicidas propanil e fenoxaprop na espécie *Echinochloa colona* (Kim et al., 2000) e a sulfonilureias em diversas espécies de plantas daninhas (Hamamura et al., 2003). Os afilhos foram obtidos de plantas de arroz crescidas em casa de vegetação, quando elas estavam entre o estágio V9 e V11, de acordo com a escala de Counce et al. (2000). Os tratamentos, a condução dos afilhos e a

determinação do comprimento de raízes utilizados neste estudo foram semelhantes aos descritos no bioensaio de plântulas. Cada unidade experimental constou de um copo plástico com capacidade de 100 mL, que recebeu 50 mL da solução herbicida de cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação da resistência aos herbicidas por meio de sementes ou em estádios iniciais do desenvolvimento das plantas pode tornar 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 de dose-resposta nos cultivares de arroz IRGA 422 CL (R) e IRGA 417 (S) em bioensaio de embebição de sementes, utilizando como variáveis-resposta o comprimento do coleóptilo e a porcentagem de germinação de sementes. O comprimento do coleóptilo, expresso como porcentagem da testemunha não tratada, foi adequado na expressão da resistência aos herbicidas (Figura 1A). A porcentagem de germinação não foi adequada para essa determinação nas condições experimentais citadas anteriormente (Figura 1B). Foram encontradas diferenças entre o cultivar resistente (R) e o cultivar suscetível (S) em relação ao comprimento do coleóptilo (Tabela 1). Aos sete dias após a embebição, as concentrações dos herbicidas necessárias para reduzir o comprimento do coleóptilo em 50% (GR50), para os cultivares R e S, foram de 0,03 e 0,001 mM, respectivamente. Dessa forma, o cultivar IRGA 422 CL foi 31 vezes mais resistente que o IRGA 417 (Tabela 1). 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 a utilização do comprimento de coleóptilo também foi adequada na discriminação entre biótipos R e S.

A variável porcentagem de germinação de sementes não discriminou os materiais utilizados neste experimento (Figura 1B). Entretanto, avaliando a mesma característica, Kuk et al. (2003) discriminaram os biótipos S e R ao herbicida imazosulfuron da planta

daninha *Monochoria vaginalis*. As diferenças relativas à quantidade e ao tipo de reservas proteicas e ao início da necessidade de síntese de aminoácidos podem estar relacionadas à ocorrência ou não de efeitos na germinação de sementes.

O comprimento da raiz, expresso como porcentagem da testemunha não tratada, também foi uma variável apropriada à identificação da suscetibilidade aos herbicidas no bioensaio de germinação de sementes (Figura 2A). O fator de resistência (FR) obtido pela relação entre o GR50 dos cultivares R e S mostrou que os cultivares IRGA 422 CL, SATOR CL e PUITÁ INTA CL são 3, 18 e 9 vezes mais resistentes que o IRGA 417 (Tabela 2).

A diferente localização das mutações no gene ALS responsáveis pela resistência aos herbicidas desses cultivares pode ter causado distintos 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). Em sementes de *Setaria viridis* embebidas em diversas doses de trifluralina, foi possível diagnosticar a resistência em apenas cinco dias após a embebição nos tratamentos (Beckie et al., 1990). No presente trabalho, as avaliações foram feitas sete dias após a embebição das sementes, indicando que o método do diagnóstico da resistência pela embebição de sementes economiza tempo e espaço. Esse tipo de teste também foi realizado

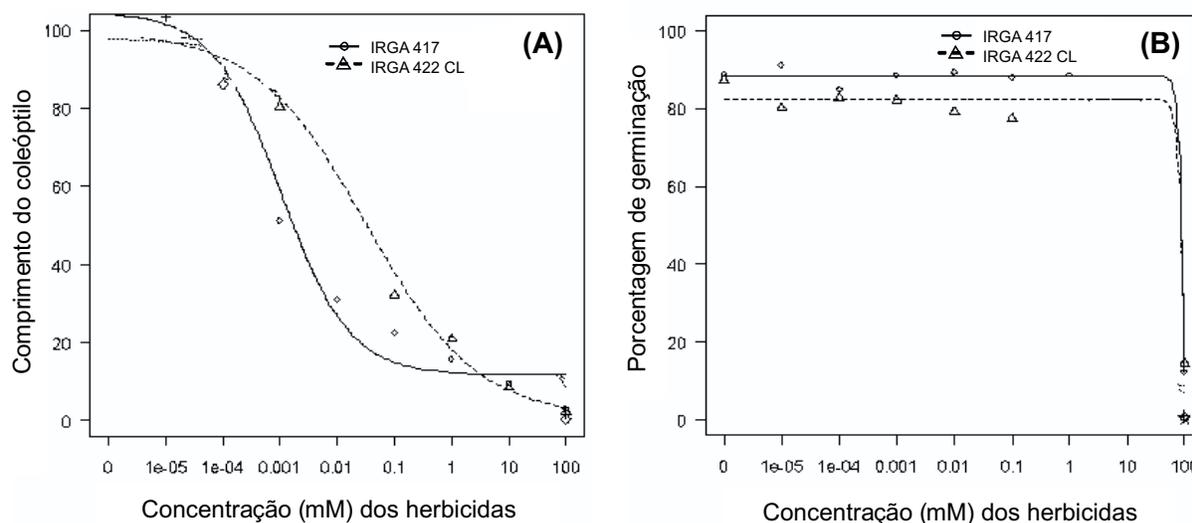


Figura 1 - Curvas de dose-resposta com relação ao comprimento do coleóptilo, expresso como porcentagem da testemunha não tratada (A) e porcentagem de germinação de sementes (B), do cultivar de arroz irrigado resistente IRGA 422 CL e do cultivar suscetível IRGA 417, submetidos à embebição de sementes em soluções contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.

Tabela 1 - Equação logística de quatro parâmetros e fator de resistência (FR) com relação ao comprimento do coleóptilo do cultivar de arroz irrigado resistente IRGA 422 CL e do cultivar suscetível IRGA 417, submetidos à embebição de sementes em solução contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic

Cultivar	$b^{1/}$	$c^{2/}$	$d^{3/}$	GR ₅₀ ^{4/}		Fator de Resistência	
				Concentração ^{5/}	IC ^{6/} 95%	FR ^{7/}	IC 95%
IRGA 417	0,73	11,71	104,63	0,001	(0,001 - 0,0002)		
IRGA 422 CL	0,45	0,57	99,89	0,03	(0,02 - 0,04)	31,08	(25,80 - 36,36)

^{1/} b : declividade da curva; ^{2/} c : limite inferior; ^{3/} d : limite superior; ^{4/} GR50: dose dos herbicidas imazethapyr + imazapic que causa 50% de redução no comprimento do coleóptilo; ^{5/} Concentração em mM; ^{6/} IC: Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; ^{7/} Fator de resistência = GR50 do cultivar resistente/GR50 de IRGA 417.



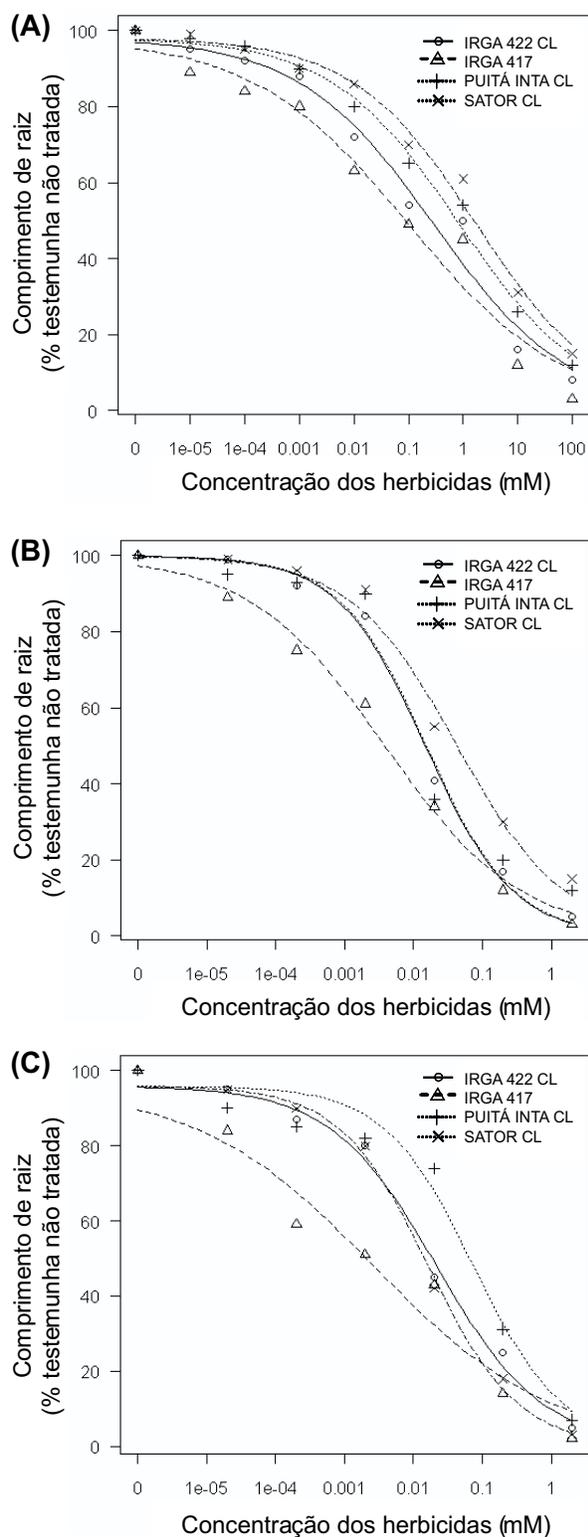


Figura 2 - Curvas de dose-resposta do comprimento da raiz, expresso em relação à porcentagem da testemunha não tratada, de cultivares de arroz irrigado submetidos à embebição de sementes (A), plântulas (B) e afilhos (C), em soluções contendo os herbicidas imazethapyr + imazapic.

para detectar resistência aos herbicidas inibidores das enzimas ACCase (Tal et al., 2000), ALS (Beckie et al., 2000) e EPSPs (Escorial et al., 2001; Perez & Kogan, 2003).

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. Nesse 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 desses bioensaios para identificação de indivíduos de arroz-vermelho resistente através de estudos dessa natureza pode ser com os cultivares IRGA 422 CL e IRGA 417 como padrão conhecido de resistência e suscetibilidade, respectivamente.

A segunda fase de desenvolvimento das plantas para a 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 2B). A diferença na redução do crescimento de raiz do cultivar suscetível IRGA 417 já pode ser observada a partir da concentração de 0,0002 M. Na concentração de 2,0 M, apenas o cultivar SATOR CL apresentou raízes com comprimento superior a 10% da respectiva testemunha não tratada. Destaca-se que os cultivares IRGA 422 CL e PUITÁ INTA CL mostraram semelhante comportamento em relação ao efeito do herbicida avaliado (Figura 2B, Tabela 2). A concentração de 0,004 M foi suficiente para reduzir o comprimento de raiz do cultivar suscetível IRGA 417 em 50%, enquanto houve necessidade das concentrações de 0,01, 0,02 e 0,04 M para obter o mesmo efeito em IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL, respectivamente. Em relação ao fator de resistência, os cultivares IRGA 422 CL, PUITÁ INTA CL e SATOR CL foram 4, 4 e

Tabela 2 - Equação logística de três parâmetros^{1/} e fator de resistência (FR) nos bioensaios de sementes, plântulas e afilhos referentes ao comprimento de raiz, em função do efeito dos herbicidas imazethapyr + imazapic em quatro cultivares de arroz

Cultivar	b ^{2/}	GR ₅₀ ^{3/}		Fator de Resistência	
		Concentração ^{4/}	IC ^{5/} 95%	FR ^{6/}	IC ^{5/} 95%
Bioensaio de sementes					
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)
Bioensaio de plântulas					
IRGA 417	0,44	3,84	(3,41 - 4,19)		
IRGA 422 CL	0,68	14,71	(13,57 - 15,82)	3,86	(2,71 - 5,01)
PUITÁ INTA CL	0,69	15,46	(14,21 - 16,59)	4,05	(2,82 - 5,28)
SATOR CL	0,56	43,29	(39,74 - 46,72)	11,31	(7,88 - 14,74)
Bioensaio de afilhos					
IRGA 417	0,34	2,62	(2,25 - 2,95)		
IRGA 422 CL	0,56	21,58	(19,07 - 22,93)	8,15	(1,41 - 14,95)
PUITÁ INTA CL	0,67	75,34	(67,92 - 82,08)	28,16	(4,95 - 51,38)
SATOR CL	0,67	16,37	(14,72 - 17,28)	6,22	(1,12 - 11,43)

^{1/} Parâmetro d (limite superior) = 98,1, 99,9 e 95,9 para todos os cultivares dos bioensaios de sementes, plântulas e afilhos, respectivamente; ^{2/} b: declividade da curva; ^{3/} GR50: dose dos herbicidas imazethapyr + imazapic que causa 50% de redução no crescimento de raiz; ^{4/} Concentração em mM; ^{5/} IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade; ^{6/} Fator de resistência = GR50 do cultivar resistente/GR50 de IRGA 417.

11 vezes mais resistente, que o IRGA 417 (Tabela 2).

No presente estudo, a determinação dos resultados ocorreu após sete dias da implementação dos tratamentos. Bioensaios de diagnóstico da resistência aos herbicidas com plântulas também foram realizados 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; o período de quatro dias foi suficiente para identificar sintomas em plantas suscetíveis a esses herbicidas. Variações no tamanho das plântulas, nos requerimentos da espécie e nas condições experimentais podem estar relacionadas às diferenças na duração desses períodos. O bioensaio de plântulas oferece grande potencial de uso na diferenciação entre biótipos de arroz cultivado resistentes e suscetíveis a herbicidas pertencentes ao grupo químico das imidazolinonas. O diagnóstico da resistência pode ocorrer com a coleta de plântulas sob suspeita de resistência e realização da exposição delas aos herbicidas imazethapyr +

imazapic na concentração de 0,004 M, conforme metodologia descrita para este bioensaio. Esse método mostrou-se conveniente pela rapidez, pela facilidade de execução e pelo fato de os resultados apresentarem boa precisão em relação à discriminação da resistência.

A terceira fase na qual se buscou determinar métodos de diagnose da resistência foi o período de afilhamento. O comprimento de raízes em relação à porcentagem da testemunha não tratada também se mostrou adequado na determinação da resistência quando as plantas estavam nos estádios de V9 a V11, de acordo com a escala de Counce et al. (2000) (Figura 2C). Neste estudo, já na menor dose do herbicida (0,00002 M) foi possível observar diferença em relação à redução no crescimento de raiz do cultivar suscetível IRGA 417. As doses que reduziram 50% o comprimento de raízes dos 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 2). Os fatores de resistência dos cultivares no bioensaio de afilhos para IRGA 422 CL, SATOR CL e



PUITÁ INTÁ CL foram, respectivamente, 8, 6 e 28 vezes mais resistentes que os do cultivar IRGA 417 (Tabela 2). A utilização do comprimento de raiz em bioensaios com plantas para discriminação da resistência tem se mostrado eficiente também em outras espécies. Em um bioensaio em que foi removido 1 cm de raiz de colmos de *Lindernia dubia*, *Monochoria vaginalis* e *Scirpus juncoides*, Hamamura et al. (2003) diagnosticaram a resistência aos herbicidas do grupo das sulfonilureias.

O nível de resistência dos cultivares de arroz resistentes aos herbicidas imidazolinonas diferiu entre bioensaios. O cultivar SATOR CL foi o mais resistente nos bioensaios de sementes e plântula, enquanto no bioensaio de afilhos o cultivar PUITÁ INTA CL foi o mais resistente. No entanto, em todos os bioensaios foi encontrada menor resistência no cultivar IRGA 422 CL em relação a SATOR CL e PUITÁ INTA CL e menor suscetibilidade do cultivar IRGA 417 em relação aos demais. A presente variação dos níveis de resistência entre esses cultivares também é observada em campo, em lavouras de arroz.

Os bioensaios de sementes, plântulas e afilhos apresentados neste estudo são discriminatórios no diagnóstico da resistência e podem ser ferramentas úteis para determinação da resistência em populações de arroz-vermelho mesmo durante o desenvolvimento da lavoura, permitindo assim a adoção de medidas que possam manter a sustentabilidade do controle de arroz-vermelho por meio de cultivares de arroz resistentes a herbicidas imidazolinonas.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Rio Grandense de Arroz (IRGA), pelo fornecimento do material vegetal; ao Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (FONTAGRO), pelo apoio financeiro; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado ao primeiro autor.

LITERATURA CITADA

BECKIE, H. J. et al. A rapid bioassay to detect trifluralin resistant green foxtail (*Setaria viridis*). **Weed Technol.**, v. 4, n. 3, p. 505-508, 1990.

BECKIE, H. J. et al. Screening for herbicide resistance in weeds. **Weed Technol.**, v. 14, n. 2, p. 428-445, 2000.

BURGOS, N. R. et al. Red rice status after five years of Clearfield™ rice. **Weed Technol.**, v. 22, n. 1, p. 200-208, 2008.

BURKE, I. C. et al. A seedling assay to screen aryloxyphenoxypropionic acid and cyclohexanedione resistance in johnsongrass (*Sorghum halepense*). **Weed Technol.**, v. 20, n. 5, p. 950-955, 2006.

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

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

ESCORIAL, M. C. et al. Rapid method to determine cereal plant response to glyphosate. **Weed Technol.**, v. 15, n. 4, p. 697-702, 2001.

HAMAMURA, K. et al. Identification of sulfonilurea-resistant biotypes of paddy field weeds using a novel method based on their rooting responses. **Weed Biol. Manag.**, v. 3, n. 4, p. 242-246, 2003.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ – IRGA. **Arroz irrigado no RS – área, produção e rendimento**. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2008.

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

KUK, Y. I. et al. Rapid diagnosis of resistance to sulfonilurea herbicides in monochoria (*Monochoria vaginalis*). **Weed Sci.**, v. 51, n. 3, p. 305-311, 2003.

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. de 2003, 10 mar. de 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 em: 15 mar. 2009.

MCCOURT, J. A. et al. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. **Proc. National Acad. Sci. USA**, v. 17, n. 3, p. 569-573, 2006.



- MENEZES, V. G. et al. Arroz-vermelho (*Oryza sativa*) resistente aos herbicidas imidazolinonas. **Planta Daninha**, v. 27, p. 1047-1052, 2009.
- MEROTTO JR., A.; JASIENIUK, M.; FISCHER, A. J. Estimating the outcrossing rate of smallflower umbrella sedge (*Cyperus difformis* L.) using resistance to ALS-inhibiting herbicides and SRAP molecular markers. **Weed Res.**, v. 49, n. 1, p. 29-36, 2009.
- NOLDIN, J. A. et al. Desempenho de populações híbridas F2 de arroz-vermelho (*Oryza sativa*) com arroz transgênico (*O. sativa*) resistente ao herbicida amônio-glyphosate. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 381-395, 2004.
- PEREZ, A.; KOGAN, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. **Weed Res.**, v. 43, n. 1, p. 12-19, 2003.
- 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 em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- RAJGURU, S. N. et al. Mutations in the red-rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. **Weed Sci.**, v. 53, n. 5, p. 567-577, 2005.
- RASBAND, W. S. **Image J Software.** U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>> Acesso em: jan. 1997.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. E. Bioassays using R. **J. Sta. Soft.**, v. 12, n. 5, p. 1-22, 2005.
- SOCIEDADE SUL BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO - SOSBAI. Arroz irrigado: Manual de recomendações técnicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5.; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27., 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas: CBAI, 2007. p. 154.
- TAL, A.; KOTOULA-SYKA, E.; RUBIN, B. Seed-bioassay to direct grass weeds resistant to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. **Crop Protec.**, v. 19, n. 7, p. 467-472, 2000.
- TAN, S. et al. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. **Pestic. Manag. Sci.**, v. 61, n. 3, p. 246-257, 2005.
- TREZZI, M. M. et al. Bioensaios para identificação de biótipos de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla a inibidores da ALS e da PROTOX. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 563-571, 2006.
- VIDAL, R. A.; LAMEGO, F. P.; TREZZI, M. M. Diagnóstico da resistência aos herbicidas em plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 597-604, 2006.
- VILLA, S. C. C. et al. Arroz tolerante a imidazolinonas: controle do arroz vermelho, fluxo gênico e efeito residual do herbicida em culturas sucessoras não-tolerantes. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 761-768, 2006.
- WEBSTER, E. P.; MASSON, J. A. Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. **Weed Sci.**, v. 49, n. 5, p. 652-657, 2001.
- WEBSTER, T. M. The southern states 10 most common and troublesome weeds in rice. **Proc. South. Weed Sci. Soc.**, v. 53, n. 3, p. 247-274, 2000.

