

CULTURAS RESISTENTES AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS: REVISÃO DE LITERATURA

ANA CAROLINA ROSO*
RIBAS ANTONIO VIDAL**

O objetivo desta revisão de literatura foi abordar os principais aspectos genéticos e as técnicas empregadas no desenvolvimento de culturas resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS, bem como seus impactos na agricultura. O principal fator limitante a elevados níveis de produtividade das culturas é a interferência com as plantas daninhas. O melhoramento genético e técnicas de engenharia genética permitiram desenvolver culturas resistentes aos herbicidas. Estas culturas constituem estratégias de manejo para obtenção de alta produtividade de alimentos para suprir a elevada demanda global para os próximos anos. Como os inibidores da enzima ALS foram os pioneiros no Brasil a terem culturas resistentes e por ser o grupo de herbicidas mais utilizados no país, a análise da situação de culturas resistentes a esses produtos serve de modelo para entender os benefícios e os riscos associados à utilização de culturas resistentes aos herbicidas.

PALAVRAS-CHAVE: RESISTÊNCIA; MUTANTES; TRANSGÊNICOS; ALS; HERBICIDA.

* Engenheira Agrônoma, M.Sc. em Fitotecnia com ênfase em herbologia, Doutoranda em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS (e-mail: roso_ac@yahoo.com.br).

** Engenheiro Agrônomo, PhD em Herbologia, Professor, Departamento Plantas de Lavoura, Bolsista CNPq, UFRGS, Porto Alegre, RS (e-mail: ribas.vidal@ufrgs.br).

1 INTRODUÇÃO

A estimativa para os próximos 40 anos é de que a população mundial atinga 9,2 bilhões de habitantes (FAO, 2011). Portanto, a produção global de alimentos precisa aumentar em 70% a fim de suprir essa demanda. Porém, as terras aráveis disponíveis estão atingindo o seu máximo de utilização, e frente a políticas ambientais de conservação tendem a diminuir. Para alimentar o mundo em 2050, avanços biotecnológicos na agricultura moderna são essenciais. As plantas daninhas configuram os principais fatores limitantes para a obtenção de elevado volume de alimentos em nível mundial. Entre os aspectos que as tornam limitadoras de produção destacam-se o expressivo impacto na produtividade e a resistência de infestantes aos herbicidas.

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas assume grande importância, principalmente, em razão do limitado número de herbicidas alternativos para serem utilizados no controle dos biótipos resistentes. A resistência, em plantas daninhas, surge em função da pressão de seleção gerada pelo herbicida mediante processo de evolução independente, ou a resistência pode ser oriunda de processo de fluxo gênico com espécies cultivadas resistentes aos herbicidas (MAXWELL e MORTIMER, 1994; ROSO *et al.*, 2010).

Os mecanismos de resistência aos herbicidas em plantas daninhas podem ser devidos a mutações no gene alvo do herbicida, resultando em insensibilidade, aumento ou super expressão da enzima alvo, metabolização desses compostos, absorção reduzida do produto, redução da quantidade do herbicida que atinge o local de ação na planta-alvo através de translocação reduzida, ou de seu sequestro e compartimentalização (ROSO e VIDAL, 2010).

O uso dos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) aumentou intensamente desde a sua introdução nos anos 80. Em 1994, já tinham sido liberados no mercado 30 produtos com essa característica, sendo conhecidas mais de 50 moléculas comerciais desses herbicidas (HEAP, 2011). A rápida adoção desses produtos justifica-se pelo fato de controlarem amplo espectro de plantas daninhas, de exigirem baixas concentrações, por serem seletivos a várias culturas e por apresentarem baixa toxicidade ao homem e ao ambiente (McCOURT *et al.*, 2006).

Já foram identificados em todo o mundo 365 biótipos resistentes aos herbicidas, totalizando 197 espécies resistentes a produtos com diferentes mecanismos de ação distribuídos em 60 países (ROSO e VIDAL, 2010). Dentre os 365 biótipos identificados, aproximadamente, 31% são de plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS (HEAP, 2011). Na maioria dos casos, a resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da enzima ALS resulta da mutação do gene ALS com redução da sensibilidade a esses herbicidas (TRANSEL e WRIGHT, 2002).

O conhecimento dos mecanismos de resistência em plantas daninhas resistentes aos inibidores da ALS, a utilização de técnicas convencionais de melhoramento genético, e o uso da engenharia genética e molecular permitiram desenvolver culturas resistentes aos herbicidas com diferentes mecanismos de ação.

Os inibidores da enzima ALS foram os pioneiros no Brasil com a liberação do cultivo comercial de soja resistente a sulfonilureias (MONQUERO, 2005). O milho resistente às imidazolinonas foi a primeira cultura resistente a ser comercializada no ano de 2003 (GREEN e OWEN, 2011). Esses herbicidas caracterizam-se por serem pioneiros no lançamento de culturas resistentes e por formarem o grupo de herbicidas mais utilizados nacionalmente. Assim, a análise da situação de culturas resistentes a esses produtos serve de modelo para entender os benefícios e os riscos associados à utilização de culturas resistentes aos herbicidas. Nesta revisão de literatura, objetivou-se abordar as principais culturas resistentes aos inibidores de ALS utilizados no Brasil e no mundo.

2 CULTURAS RESISTENTES AOS HERBICIDAS

Os métodos de desenvolvimento de culturas resistentes aos herbicidas, de forma geral, dividem-se em transgênicos e não transgênicos. O primeiro cenário consiste em processo artificial

de inserção de um gene de interesse, promovendo insensibilidade ao local de ação, superexpressão da enzima-alvo ou metabolização do herbicida. Os métodos não transgênicos caracterizam-se basicamente pela busca de mutantes. A seleção de indivíduos mutantes pode ocorrer por meio de variação somaclonal, mutação induzida, seleção de células ou sementes contendo mutações e, ainda, mediante hibridização simples (DUKE *et al.*, 2002).

Métodos não transgênicos são utilizados com maior frequência no desenvolvimento de culturas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS (TAN, EVANS e SINGH, 2006). Células altamente resistentes a sulfonilureias foram selecionadas em cultura de tecido de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (CHALEFF e RAY, 1984). Em 1992 foi introduzida, comercialmente, a primeira cultura resistente às imidazolinonas mediante métodos de seleção de células de calos em milho, seguidos de cruzamentos convencionais (BRIGHT *et al.*, 1992; BERNASCONI *et al.*, 1995).

A seguir, serão analisadas as culturas resistentes aos inibidores de ALS em utilização no Brasil e no mundo quanto a: ano de lançamento comercial no mundo (e no Brasil, quando for o caso), técnicas empregadas para a obtenção da cultura, mutação no gene ALS responsável pela resistência, número de cópias do gene ALS e o nível de ploidia das principais culturas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS (Tabela 1).

3 CULTURAS RESISTENTES AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS NO BRASIL

3.1 ARROZ (*Oryza sativa* L.)

O desenvolvimento de cultivares de arroz resistente as imidazolinonas ocorreu a partir de sementes da linhagem AS3510 que foram mutagenizadas com etil-metanossulfonato (EMS) (CROUGHAN, 1998). As plantas oriundas dessas sementes foram pulverizadas com o herbicida imazetapir e apenas pequena porcentagem sobreviveu, com a progênie desse arroz mostrando-se tolerante aos herbicidas inibidores da ALS (CROUGHAN, 1998). Essa linhagem de mutantes foi referida como 93AS3510 e, a partir dessa, 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' (culturas resistentes as imidazolinonas) comercializadas nos Estados Unidos da América (EUA) (WEBSTER e MASSON., 2001; GEALY, MITTEN e RUTGER, 2003). Técnica similar de mutagênese foi empregada sobre a cultivar de arroz Cypress, originando a linhagem PWC16, que foi utilizada para o 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 as imidazolinonas (LIVORE *et al.*, 2003).

A mutação responsável pela resistência na linhagem 93AS3510 foi Gly₆₅₄Glu, também representada por G₆₅₄E (TAN *et al.*, 2005) e, na linhagem PWC16, corresponde à mutação Ser₆₅₃Asp (S₆₅₃D) (RAJGURU *et al.*, 2002; TAN *et al.*, 2005). Já a mutação que conferiu resistência a cultivar PUITÁ INTA CL foi Ala₁₂₂ para Thr₁₂₂ (A₁₂₂T) (LIVORE *et al.*, 2003).

No Brasil, a cultivar de arroz resistente aos 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 conter o gene que confere tolerância aos herbicidas imazetapir + imazapique e, ainda, por apresentar ciclo médio (121 a 135 dias), pubescência do limbo média, cor da folha verde clara e peso de 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).

TABELA 1 - PRINCIPAIS CULTURAS RESISTENTES AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS, ANO INICIAL DE COMERCIALIZAÇÃO, TÉCNICA UTILIZADA PARA A OBTENÇÃO DA RESISTÊNCIA, NÍVEL DE PLOIDIA DAS CULTURAS, NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE ALS E MUTAÇÕES IDENTIFICADAS

CULTURAS	ANO	TÉCNICA EMPREGADA	NÍVEL DE PLOIDIA	CÓPIAS GENE ALS	MUTAÇÕES	REFERÊNCIAS
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	1994	- Mutagênese de sementes (EMS) ¹	Diploide 2n=2x=40	2	Pro ₁₉₇ Ser	Sebastian <i>et al.</i> , 1989
<i>Oryza sativa</i> L.	2001	- Mutagênese de sementes (EMS)	Diploide 2n=2x=24	1	Gly ₆₅₄ Glu Ser ₆₅₃ Asp Ala ₁₂₂ Thr	Croughan, 1998; Tan <i>et al.</i> , 2005; Tranel e Wright, 2002
<i>Zea mays</i> L.	1992	- Cultura de tecidos (seleção de células de calos) - Mutagênese de grãos de pólen (EMS) - Transgenia (inserção genes HRA e GAT)	Diploide 2n=2x=20	2	Trp ₅₇₄ Leu Pro ₁₀₇ Ala Ser ₆₅₃ Asp	Bright, 1992 Dietrich, 1998 Green <i>et al.</i> , 2009
<i>Brassica napus</i> L.	1995	-Mutagênese de microsporos (ENU) ²	Alotetraploide 2n=4x=38	5	Trp ₅₇₄ Leu Ser ₆₅₃ Asp	Swanson <i>et al.</i> , 1989; Hattori <i>et al.</i> , 1995; Rutledge <i>et al.</i> , 1991.
<i>Beta vulgaris</i> L.	1999	- Cultura de células somáticas - Transgenia (inserção gene ALS insensível)	Genomas A e C Diploide 2n=2x=18	1	Ala ₁₃₃ Thr Pro ₁₈₈ Ser	Wright e Penner, 1998; D'Halluin <i>et al.</i> , 1992
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	1996	- Cultura de células embriogênicas	Diploide 2n=2x=52	NI ⁴	Trp ₅₆₅ Cys Trp ₅₆₃ Ser	Rajasekaran <i>et al.</i> , 1996.
<i>Helianthus annuus</i>	2003	- Seleção de tipo silvestre tolerante seguido de retrocruzamentos - Mutagênese de sementes (EMS)	Diploide 2n=2x=34	2	Ala ₂₀₅ Val Ala ₁₂₂ Thr	Al-Khatib <i>et al.</i> , 1998 Sala <i>et al.</i> , 2008a; Sala <i>et al.</i> , 2008b White <i>et al.</i> , 2003; Bruniard e Miller, 2001.
<i>Linum usitatissimum</i> L.	1998	- Transgenia (inserção gene ALS insensível)	Diploide 2n=2x=30	NI	NI	Haughn <i>et al.</i> , 1988.
<i>Sorghum bicolor</i>	2004	- Seleção de tipo silvestre tolerante seguido de retrocruzamentos	Diploide 2n=2x=10	NI	NI	Tuinstra <i>et al.</i> , 2009.
<i>Triticum aestivum</i> L.	2001	- Mutagênese de sementes (NaN ₃) ³	Hexaploide 2n=6x=42 Genomas A, B e D	3	Ser ₆₅₃ Asp	Newhouse <i>et al.</i> , 1992; Pozniak <i>et al.</i> , 2004

¹Agente mutagênico denominado etil metano sulfonato; ² Agente mutagênico denominado N-ethyl-N-nitrosourea; ³ Agente mutagênico denominado azida sódica; ⁴ Não identificado. (Adaptado de GREEN *et al.*, 2008).

A 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 orizícolas do estado do Rio Grande do Sul (SOSBAI, 2007). Essa cultivar apresenta folhas curtas eretas e pilosas, e peso de 1000 grãos de 27,6 g (IRGA, 2009). A cultivar SATOR CL, híbrido de arroz, apresenta alta resistência aos herbicidas imazetapir + imazapique, ciclo médio (121 a 135 dias), com boa adaptabilidade a zonas temperadas, subtropicais e tropicais. Na safra 2006/07, alcançou produtividade média de 15 t ha⁻¹ no município de Jaguarão/RS (SOSBAI, 2007). Ainda não se dispõe na literatura das informações agronômicas da cultivar PUITA CL, recentemente introduzida da Argentina.

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 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 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.

O arroz vermelho resistente pode surgir por evolução natural ou por fluxo gênico. Kuk, Burgos e Shivrain (2008) verificaram 130 acessos de arroz vermelho provenientes de 26 lavouras no estado do Arkansas, EUA, em relação à tolerância ao herbicida imazetapir. No sul do Brasil foram identificados biótipos de arroz vermelho resistentes devido à presença da mutação G₆₅₄E, a mesma encontrada na cultivar IRGA 422 CL, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico (ROSO *et al.*, 2010).

3.2 MILHO (*Zea mays* L.)

O milho resistente as imidazolinonas, introduzido comercialmente no ano de 1992, foi a primeira cultura resistente aos inibidores de ALS comercializada (ANDERSON e GEORGESON, 1989; BRIGHT, 1992). Cultura de tecidos de células de calos do híbrido A188 x B73 foram utilizadas para selecionar células resistentes ao herbicida imazaquin e resultaram em diversas linhagens de milho resistentes as imidazolinonas: XA17, XI12, QJ22, XS40, ZA54, UV18, AC17 e QT15 (TAN *et al.*, 2005). As linhagens QJ22 e XI12 com a mutação Ser₆₅₃Asp são resistentes apenas ao grupo das imidazolinonas, enquanto XA17 com mutação Trp₅₇₄Leu, é resistente às imidazolinonas, sulfonilureias, pirimidiltiobenzoatos e triazolopirimidinas (DIETRICH, 1998).

Diversas linhagens de milho tolerante as imidazolinonas foram obtidas a partir de mutantes denominados: mutante1 e mutante2 (BRIGHT, 1992). Esses mutantes foram obtidos utilizando-se etil metano sulfonato (EMS) para a mutação dos grãos de pólen da linhagem UE95. O mutante1 tem a mutação Ala₁₂₂Thr e o 2 a mutação Ser₆₅₃Asp, sendo ambos resistentes apenas ao grupo das imidazolinonas (BRIGHT, 1992; TAN *et al.*, 2005). A variedade de milho IC8532IT também foi obtida pela técnica de mutagênese de grãos de pólen, porém com mutação em posição atípica Ala₁₅₅Thr gerando resistência às imidazolinonas e a pirimidiltiobenzoatos (BERNASCONI *et al.*, 1995).

Nova linhagem de milho foi desenvolvida com resistência múltipla aos inibidores da ALS e ao herbicida glifosato utilizando-se os genes HRA e GAT, respectivamente (GREEN *et al.*, 2008). O gene HRA codifica a enzima ALS com duas mutações (Trp₅₇₄Leu e Pro₁₉₇Ala), conferindo alta resistência aos herbicidas inibidores dessa enzima (BEDBROOK *et al.* 1995). Trp₅₇₄Leu confere resistência aos quatro grupos dos inibidores da ALS, enquanto Pro₁₉₇Ala confere resistência às sulfonilureias e às triazolopirimidinas (TRANEL e WRIGHT, 2002). Um vetor de expressão contendo os genes HRA e GAT (glyphosate acetil transferase) e promotor constitutivo foi desenvolvido, visando

a obtenção de plantas transgênicas de milho com múltipla resistência aos herbicidas inibidores da ALS e ao glifosato (GREEN *et al.*, 2008). Esse transgênico foi mil vezes mais resistente aos herbicidas clorimurrom e sulfometurrom e não ocorreu alteração na tolerância natural de milho aos herbicidas seletivos (GREEN *et al.*, 2009).

3.3 SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.]

A linhagem comercial de soja especificamente resistente aos herbicidas clorimurrom e tifensulfurrom, pertencentes ao grupo das sulfonilureias, foi desenvolvida pela técnica de mutagênese de sementes utilizando EMS (SEBASTIAN *et al.*, 1989). A mutação responsável pela resistência é Pro₁₉₇Ser, localizada em apenas uma das duas cópias do gene ALS presentes em soja.

A introdução da soja tolerante as sulfonilureias possibilitou aplicações múltiplas do herbicida clorimurrom ou desse combinado com outras sulfonilureias ou com algumas imidazolinonas, promovendo maior período de controle de plantas daninhas ao longo do ciclo da cultura e redução de injúrias na soja (CULPEPPER *et al.*, 1997).

4 CULTURAS RESISTENTES AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ENZIMA ALS NO MUNDO

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) resistente as sulfonilureias e as imidazolinonas foi obtido a partir de seleção de cultura de células embriogênicas em suspensão (variedades SJ2 e B1654), sem o uso de mutagênicos. A análise da sequência nucleotídica dos clones derivados das colônias de células resistentes revelou a presença do local de alteração na enzima ALS na posição 563, resultando nas mutações Trp₅₆₃Cys e Trp₅₆₃Ser (RAJASEKARAN, GRULA e ANDERSON, 1996). Quatro novos mutantes de algodão altamente tolerantes ao herbicida imazamoxi foram registrados pela Universidade do Texas e USDA. Esses mutantes foram obtidos a partir de estoques genéticos gerados mediante mutagênese com EMS em sementes das cultivares SC 9023, Rocket e Explorer, sendo posteriormente selecionadas com o herbicida imazamoxi. As mutações nesses materiais são desconhecidas (BECHERE *et al.*, 2010).

A beterraba açucareira (*Beta vulgaris* L.) resistente as sulfonilureias foi desenvolvida mediante cultura de tecido de células somáticas (HART, SAUNDERS e PENNER, 1992). A beterraba açucareira, espécie diplóide, apresenta uma única cópia do gene ALS (WRIGHT e PENNER, 1998). O gene ALS resistente, nessa espécie, foi herdado como característica monogênica de forma semi-dominante (HART, SAYNDERS e PENNER, 1993).

As variedades de beterraba açucareira, desenvolvidas por meio de cultura de tecidos, apresentam diferentes classes de resistência: apenas às imidazolinonas (Sir-13 e 93R30B) ou apenas às sulfonilureias (Sur) (WRIGHT *et al.*, 1998). A mutação Ala₁₁₃Thr foi encontrada em Sir-13 e a Pro₁₈₈Ser na variedade Sur. Já a análise da sequência nucleotídica da variedade 93R30B indicou a presença das duas mutações Ala₁₁₃Thr e Pro₁₈₈Ser. Nessa variedade, os níveis de resistência aos grupos imidazolinonas e sulfonilureias foram elevados, sugerindo efeito aditivo e sinérgico de duplos mutantes (WRIGHT *et al.*, 1998).

O método de transformação genética via *Agrobacterium* também foi utilizado para o desenvolvimento de beterraba açucareira resistente às sulfonilureias. Porém, a cultura foi desenvolvida para promover a resistência ao herbicida de amplo espectro glufosinato de amônio (introdução do gene BAR), bem como promover a resistência às sulfonilureias (introdução gene ALS resistente) (D'HALLUIN *et al.*, 1992).

A cultivar de canola (*Brassica napus* L.) Clearfield foi desenvolvida a partir de microsporos da variedade Topas submetidos ao agente mutagênico etil nitrosureias e subsequente seleção de

duplo haplóide resistente ao herbicida imazetapir (SWANSON *et al.*, 1989). Os mutantes tolerantes selecionados, PM1 e PM2, originaram todas as variedades de canola resistentes as imidazolinonas (TAN *et al.*, 2005). A introdução comercial dessa variedade ocorreu no ano de 1995 e salienta-se que as mutações presentes em PM1 e PM2 são Ser₆₅₃Asp e Trp₅₇₄Leu, respectivamente (RUTLEDGE *et al.*, 1991; HATTORI *et al.*, 1995). Apesar de ambos os mutantes conferirem resistência às imidazolinonas, o nível de resistência atribuído ao PM2 é bem mais elevado (SWANSON *et al.*, 1989). Alcança-se alto nível de resistência nas variedades de canola quando as duas mutações estão juntas e em homozigose.

Sementes da cultivar de cevada (*Hordeum vulgare* L.), denominada Bod, foram submetidas ao agente mutagênico azida sódica e as populações mutantes foram selecionadas pela aplicação de herbicidas imidazolinonas. A análise da sequência nucleotídica desses mutantes revelou a presença da mutação Ser₆₅₃Asn (LEE *et al.*, 2011). As características fenotípicas das linhagens mutantes são promissoras e oferecem as bases para a liberação de cultivares de cevada resistentes as imidazolinonas.

Girassol (*Helianthus annuus* L.) tolerante a imazetapir foi descoberto em campo de soja no Kansas, EUA (AL-KHATIB *et al.*, 1998). Sementes dessa planta silvestre foram utilizadas como doadoras da tolerância as imidazolinonas em cultivares de girassol (MILLER e AL-KHATIB, 2002). O modelo bigênico, na qual um gene semidominate maior (Imr1) interage com o gene modificador (Imr2), foi proposto para explicar a resistência aos herbicidas imidazolinonas em girassol (BRUNIARD e MILLER, 2001). A resistência completa em girassol só pode ser alcançada pela homozigose de ambos os genes de resistência (Imr1Imr1Imr2Imr2) em linhagem oriunda de introgressão ou em híbrido (BRUNIARD e MILLER, 2001).

Diversas empresas de sementes têm introduzido a característica de tolerância em suas próprias linhagens de girassol e as variedades tolerantes às imidazolinonas (girassol Clearfileld) foram primeiramente comercializadas nos EUA, Argentina e Turquia no ano de 2003 (TAN *et al.*, 2005).

Sequenciamento de DNA revelou a mutação Ala₂₀₅Val presente no gene ALS como responsável pela resistência as imidazolinonas em girassol (BRUNIARD, 2001). Em biótipos de população silvestre de Dakota do Sul também foi identificada a mutação Ala₂₀₅Val (WHITE *et al.*, 2003). A linhagem de girassol CLHA-Plus, resistente às imidazolinonas, foi desenvolvida mediante mutagênese das sementes com EMS e selecionada com imazapir (SALA, BULOS e ECHARTE, 2008a). A herança desse gene é dominante e nuclear e a mutação identificada nessa linhagem foi Ala₁₂₂Thr (SALA *et al.*, 2008b).

A cultura da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) precisou ser melhorada para resistência aos inibidores de ALS no Canadá devido à elevada persistência de herbicidas sulfonilureias no solo (McHUGHEN, 1989). O método de transformação genética via *Agrobacterium* foi utilizado para introduzir na linhaça um gene ALS oriundo de arabisopsis insensível aos herbicidas (HAUGHN *et al.*, 1988).

Sorgo (*Sorghum bicolor* L.) resistente aos inibidores de ALS foi desenvolvido a partir de 2004 por pesquisadores da Universidade do Kansas. A identificação de tipo silvestre resistente permitiu o desenvolvimento de híbridos de sorgo com resistência a esses herbicidas (TUINSTRAN *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de híbridos de sorgo resistentes aos herbicidas inibidores da ALS tem permitido o uso de vários herbicidas pós-emergentes desse grupo para o controle de plantas daninhas. O uso dos pós-emergentes nicossulfurom + rimsulfurom foi efetivo no controle de gramíneas em sorgo resistente a ALS, enquanto o controle de folhas largas foi maior quando combinado com outros herbicidas como dicamba, metsulfurom-metílico e atrazina (HENNIGH *et al.*, 2010).

Trigo (*Triticum aestivum* L.) resistente às imidazolinonas foi obtido a partir de técnicas

de mutagenicidade (NEWHOUSE *et al.*, 1992). Sementes da variedade Fidel foram submetidas à mutação com azida de sódio e quatro plantas (FS1, FS2, FS3 e FS4) foram selecionadas com o herbicida imazetapir. O mutante original FS4 e a maioria das cultivares resistentes comercializadas carregam o gene de resistência no braço longo do cromossomo 6 do genoma D do trigo (denominado AhasL-D1) (ANDERSON, MATTHIESEN e HEGSTAD, 2004; POZNIAK e HUCL, 2004). Plantas mutantes selecionadas foram utilizadas em programas de retrocruzamento, dando origem a primeira variedade de trigo resistente às imidazolinonas comercializada no ano de 2001 (TAN *et al.*, 2005). Linhagens de trigo com AhasL-A1 e AhasL-B1 também foram criadas e cultivares com múltiplos genomas resistentes ainda estão sendo desenvolvidos (POZNIAK *et al.*, 2004; TAN *et al.*, 2005).

Cultivares de trigo resistente às imidazolinonas podem eventualmente apresentar injúrias após a aplicação de imazamoxi, devido suscetibilidade ao herbicida da porção do genoma que contém a enzima ALS. Cultivares de trigo com o gene ALS resistente em dois genomas (B e D) apresentaram injúrias apenas na maior dose de imazamoxi (105 g.ha⁻¹), enquanto cultivares de trigo com o gene ALS resistente em apenas um dos genomas (B) evidenciaram injúrias nas menores doses testadas (35 g.ha⁻¹) (HANSON *et al.*, 2007). Esses resultados mostram que a natureza poliploide das cultivares interfere no nível de resistência, pois esse depende do número de genes resistentes nos diferentes genomas.

A mutação Ser₆₅₃Asp, responsável pela resistência identificada no gene ALS de ambos os genomas (B e D) de trigo é análoga a mutação encontrada na linhagem de arroz PWC16, a mutação XI12 de milho e a mutação PM1 de canola (POZNIAK *et al.*, 2004).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cenário mundial mostra número bastante expressivo de culturas resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS. Esse quadro deve-se aos avanços obtidos pelas técnicas de engenharia genética somados ao conhecimento da base molecular dos mecanismos de resistência em plantas daninhas. A maioria das culturas apresentam mutações no gene ALS, conferindo resistência à esses herbicidas. As perspectivas futuras em relação a culturas resistentes visam a obtenção de mais de um mecanismo de ação na mesma planta, ou a diversificação de características como, por exemplo, culturas resistentes a estresses bióticos e/ou abióticos somados à resistência aos herbicidas. No caso das culturas resistentes aos herbicidas ALS haveria a continuidade no uso desses importantes herbicidas.

Frente as estimativas populacionais para os próximos 50 anos, a utilização de culturas resistentes aos herbicidas oferece alternativa de manejo visando o aumento dos níveis de produtividade para suprir a demanda mundial de alimentos. Acredita-se que o emprego de diferentes técnicas e recursos genético/moleculares possibilitem o controle e a prevenção da resistência de plantas daninhas aos herbicidas.

ABSTRACT

CROPS RESISTANT TO ALS HERBICIDE: A REVIEW

The objective of this literature review was to address the main genetics aspects and techniques utilized on the development of crops resistant to ALS inhibitors and its impact on agriculture. The main factor to limit the high levels of crop productivity is the interference with weeds. Genetic improvement and genetic engineering tools have enabled the development of crops resistant to herbicides. These crops are management strategies to achieve high levels of food productivity and supplement the high global demand for the next years. As the ALS inhibitors were pioneers in Brazil to have resistant crops and for being the most widely used group of herbicides in the country, the analysis of these crops provide a model to understand the benefits and risks associated to the use of herbicide resistant crops.

KEY-WORDS: RESISTANCE; MUTANT; TRANSGENIC; ALS HERBICIDE.

REFERÊNCIAS

- 1 AL-KHATIB, K. *et al.* Imazetapir resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). **Weed Science**, v.46, n.4, p.403-407, 1998.
- 2 ANDERSON, J. A.; MATTHIESEN, L.; HEGSTAD, J. Resistance to an imidazolinone herbicide is conferred by a gene on chromosome 6DL in the wheat line cv. 9804. **Weed Science**, v.52, n.1, p.83-90, 2004.
- 3 ANDERSON, P. C.; GEORGESON, M. Herbicide-tolerant mutants of corn. **Genome**, v.31, n.2, p.994-999, 1989.
- 4 BECHERE, E. *et al.* Registration of four upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genetic stock mutants with tolerance to imazamoxi. **Journal of Plant Registrations**, v. 4, n. 2, p. 155-158, 2010.
- 5 BEDBROOK, J. R. *et al.* Du Pont de Nemours and Company, assignee. Nucleic acid fragment encoding herbicide resistant plant acetolactate synthase. U.S. patent 5,378,824, 1995.
- 6 BERNASCONI, P. *et al.* A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.29, p.17 381-17 385, 1995.
- 7 BRIGHT, S. W. J. *et al.* **Herbicide resistant plants**. Patent Application of World Intellectual Property Organization WO92/08794, 1992.
- 8 BRUNIARD, J. M. **Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of cross-resistance pattern, and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus* L)**, 2001. 78 p. PhD (Dissertation), North Dakota State University, Fargo, 2001.
- 9 BRUNIARD, J. M.; MILLER, J. F. Inheritance of imidazolinone-herbicide resistance in sunflower. **Helia**, v.24, n.1, p.11-16, 2001.
- 10 CHALEFF, R. S.; RAY, T. B. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell-cultures. **Science**, v.223, n.4641, p.1148-1151, 1984.
- 11 CROUGHAN, T. P. **Arroz resistente a herbicidas imidazolinonas**. United States Patent n.5,773,704.0019313, 1998.
- 12 CULPEPPER, A. S. *et al.* Sicklepod (*Senna obtusifolia*) management in an ALS-modified soybean (*Glycine max*). **Weed Technology**, v.11, n.1, p.164-170, 1997.
- 13 D'HALLUIN, K. M. *et al.* Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. **Biotechnology**, v.10, n.3, p.309-314, 1992.
- 14 DIETRICH, G. E. **Imidazolinone resistant AHAS mutants**. US Patent 5 767 361, 1998.
- 15 DUKE, S. O. *et al.* Genetic engineering crops for improved weed management traits. In: RAJASEKARAN, K.; JACKS, T. J.; FINLEY, J. W. (ed). **Crop biotechnology**. Washington, DC: American Chem Soc., 2002. p. 52-66.
- 16 FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistic for FAO**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/> Acesso em: 5 de agosto de 2011.
- 17 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**, v.17, n.3, p.627-645, 2003.
- 18 GREEN, J. M. *et al.* New multiple-herbicide crop resistance and formulation technology to augment the utility of glifosato. **Pest Management Science**, v.64, n.4, p.332-339, 2008.
- 19 GREEN, J. M. *et al.* Response of 98140 corn with GAT4621 and HRA transgenes to glifosato and ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v.57, n.2, p.142-148, 2009.
- 20 GREEN, J. M.; OWEN, M. D. K. Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant

- weed management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.11, p.5819-5829, 2011.
- 21 HANSON, B. D. *et al.* Recovery of imidazolinone-resistant hard red wheat lines following imazamoxi application. **Crop Science**, v.47, n.5, p.2058-2066, 2007.
- 22 HART, S. E.; SAUNDERS, J. W.; PENNER, D. Chlorsulfuron-resistant sugar-beet - cross-resistance and physiological-basis of resistance. **Weed Science**, v.40, n.3, p.378-383, 1992.
- 23 HART, S. E.; SAUNDERS, J. W.; PENNER, D. Semi-dominant nature of monogenic sulfonylurea herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*). **Weed Science**, v.41, n.3, p.317-324, 1993.
- 24 HATTORI, J. *et al.* An acetohydroxy acid synthasemutant reveals a single site involved in multiple herbicide resistance. **Molecular & General Genetics**, v.246, n.4, p.419-425, 1995.
- 25 HAUGHN, G. *et al.* Transformation with a mutant arabidopsis acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. **Molecular e General Genetics**, v.211, n.2, p.266-271, 1988.
- 26 HEAP, I. **International survey of herbicide resistant weeds**. Available at: <http://www.weedscience.org>. Accessed on : Aug. 9th, 2011.
- 27 HENNIGH, D. S. *et al.* Weed control with selected herbicides in acetolactate synthase-resistant sorghum. **Crop Protection**, v.29, n. 8, p.879-883, 2010.
- 28 IRGA. **Características da cultivar IRGA 417**. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action=novidades_detalhe&id=16>. Acesso em: 12 de maio de 2009.
- 29 KUK, Y. I.; BURGOS, N. R.; SHIVRAIN, V. K. Natural tolerance to imazethapyr in red rice (*Oryza sativa*). **Weed Science**, v.56, n.1, p.1-11, 2008.
- 30 LEE, H. *et al.* Single nucleotide mutation in the barley acetohydroxy acid synthase (AHAS) gene confers resistance to imidazolinone herbicides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.21, p.8909-8913, 2011.
- 31 LIVORE, A. B. **Rice plants having increased tolerance to imidazolinone herbicides**. International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT), n.WO2005/020673A1. 2003.
- 32 LOPES, M. C. B. *et al.* **IRGA 422 CL a cultivar desenvolvida para o sistema de produção clearfield arroz (2002)**. Disponível em: < <http://www.irga.rs.gov.br/arquivos/20071107163254.pdf>>. Acesso em: 13 de agosto de 2011.
- 33 MAXWELL, B. D.; MORTIMER, A. M. Selection for herbicide resistance. In: POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. (eds.). **Herbicide resistance in plants, biology and biochemistry**. Boca Ratom: CRC Press, 1994. p.1-25.
- 34 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 17, n.3, p.569-573, 2006.
- 35 McHUGHEN, A. Agrobacterium mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. **Plant Cell Reports**, v.8, n.8, p.445-449, 1989.
- 36 MILLER, J. F.; AL-KHATIB. K. Registration of imidazolinone herbicide-resistant sunflower maintainer (HA425) and fertility restorer (RHA426 and RHA427) germplasms. **Crop Science**, v.42, n.3, p.988-989, 2002.
- 37 MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v.64, n. 4, p.517-531, 2005.
- 38 NEWHOUSE, K. *et al.* Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. **Plant Physiology**, v.100, n.2, p.882-886, 1992.
- 39 POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**,

- v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.
- 40 POZNIAK, C. J. *et al.* Physiological and molecular characterization of mutation-derived imidazolinone resistance in spring wheat. **Crop Science**, v.44, n.4, p.1434-1443, 2004.
 - 41 POZNIAK, C. J.; HUCL, P. J. Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutation-derived lines of common wheat. **Crop Science**, v.44, n.1, p.23-30, 2004.
 - 42 RAJASEKARAN, K.; GRULA, J. W.; ANDERSON, D. M. Selection and characterization of mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L) cell lines resistant to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. **Plant Science**, v.119, n.1-2, p.115-124, 1996.
 - 43 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**, v.55, p.115-116, 2002.
 - 44 ROSO, A. C.; VIDAL, R. A. V. A modified phosphate-carrier protein theory is proposed as a non-target site mechanism for glifosato resistance in weeds. **Planta Daninha**, v. 28, n. 5, p. 1175-1185, 2010.
 - 45 ROSO, A. C. *et al.* Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. **Field Crops Research**, n.119, p.175-182, 2010.
 - 46 RUTLEDGE, R. G. *et al.* Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. **Molecular & General Genetics**, v.229, n.1, p.31-40, 1991.
 - 47 SALA, C. A.; BULOS, M.; ECHARTE, A. M. Genetic analysis of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. **Crop Science**, v. 48, n. 5, p. 1817-1822, 2008a.
 - 48 SALA, C. *et al.* Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 1, p. 105-112, 2008b.
 - 49 SEBASTIAN, S. A. *et al.* Semi-dominant soybean mutation for resistance to sulfonylurea herbicides. **Crop Science**, v.29, n.6, p.1403-1408, 1989.
 - 50 SOSBAI. Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: Manual de Recomendações Técnicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO 5., E REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27., 2007, Pelotas, RS. **Anais...Pelotas: CBAI, 2007.** p.154.
 - 51 SWANSON, E.B. *et al.* Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, n.4, p.525-530, 1989.
 - 52 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**, v.61, n.3, p.246-257, 2005.
 - 53 TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide tolerant crops. **Amino Acids**, v.30, n. 2, p.195-204, 2006.
 - 54 TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, v.50, n.6, p.700-712, 2002.
 - 55 TUINSTRA, M. R. *et al.* Efficacy of herbicide seed treatments for controlling Striga infestation of sorghum. **Crop Science**, v.49, n.3, p.923-929, 2009.
 - 56 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.
 - 57 WEBSTER, E. P.; MASSON, J. A. Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. **Weed Science**, v.49, n.5, p.652-657, 2001.
 - 58 WHITE, A. D.; GRAHAM, M. A.; OWEN, M. D. K. Isolation of acetolactate synthase homologs in common sunflower. **Weed Science**, v.51, n.6, p.845-853, 2003.

- 59 WRIGHT, T. R. *et al.* Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. **Weed Science**, v.46, n.1, p.13-23, 1998.
- 60 WRIGHT, T. R.; PENNER, D. Cell selection and inheritance of imidazolinone resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, n.5, p.612-620, 1998.