

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Elucidação do mecanismo de resistência de *Raphanus raphanistrum* L.  
e *Raphanus sativus* L. aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase  
(ALS)**

Leandro Oliveira da Costa

Passo Fundo

2017

Leandro Oliveira da Costa

Elucidação do mecanismo de resistência de *Raphanus raphanistrum* L. e *Raphanus sativus* L. aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Agronomia.

Orientador:  
Dr. Mauro Antônio Rizzardi  
Comitê de orientação:  
Dr. Fernando S. Adegas  
Ph.D. Magali F. Grandó

Passo Fundo

2017

CIP – Catalogação na Publicação

C331r Costa, Leandro Oliveira da  
Elucidação do mecanismo de resistência de *Raphanus raphanistrum* L. e *Raphanus sativus* L. aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS). / Leandro Oliveira da Costa. – 2017.

101 f. : il., color. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2017.

Orientador: Dr. Mauro Antônio Rizzardi.

Coorientação: Dr. Fernando S. Adegas.

Coorientação: Ph.D. Magali F. Grando.

1. Nabo. 2. Cobertura do solo. 3. Produtividade agrícola. 4. Herbicidas. I. Rizzardi, Mauro Antônio, orientador. II. Adegas, Fernando S., coorientador. III. Grando, Magali F., coorientadora. IV. Título.

CDU: 633

---

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

## ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE *Raphanus raphanistrum* L. E *Raphanus sativus* L. AOS  
HERBICIDAS INIBIDORES DA ACETOLACTATO SINTASE (ALS)

Elaborada por

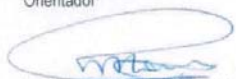
Leandro Oliveira da Costa

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
"Doutor em Agronomia – Área de Produção Vegetal"

Aprovada em: 02/05/2017  
Pela Comissão Examinadora

  
Dr. Mauro Antonio Rizzardi  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientador

  
Dra. Eunice Oliveira Calvete  
Coordenadora PPGAgro

  
Dr. Fernando Storniolo Adegas  
Embrapa Soja

  
Dr. Hélio Carlos Rocha  
Diretor FAMV

  
Dra. Magali Ferrari Grando  
UPF

  
Dr. Anderson Nunes  
IFRS

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e apoio nos momentos difíceis, superação das dificuldades, forças para lutar pelos meus sonhos e alegria pelas minhas conquistas.

Aos meus pais, Pedro Costa e Maria Ivanir O. da Costa por terem me concebido e ensinado valores como honestidade, respeito, disciplina e perseverança. Obrigada pelo amor e carinho em todos os momentos que precisei.

A UPF e PPGAgro pela estrutura necessária à elaboração e condução dos trabalhos.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil, pela concessão da bolsa do curso de doutorado.

Ao Agriculture and AgriFood Canada (AAFC), em especial, às pesquisadoras Sara L. Martin e Connie A. Sauder pela orientação na condução da pesquisa durante o período do Doutorado Sanduíche no Canadá.

Ao orientador, Prof. Mauro A. Rizzardi, pelo conhecimento transmitido, paciência nas orientações e elaboração dos trabalhos e amizade, obrigado.

Ao Prof. Mario A. Bianchi por colaborar na coleta de sementes.

Ao doutorando Joanei Cechin e à doutoranda Sabrina T. Peruzzo pelo auxílio na realização de parte desse trabalho.

Aos professores do PPGAgro pelo conhecimento transmitido e amizade.

Aos meus irmãos: Adriane Costa, Éder Costa, Lucas Costa, Felipe Costa, pelo carinho, ajuda e amizade.

A todos os amigos, familiares e colegas que de uma forma ou de outra, sempre estiveram auxiliando para que eu chegasse até aqui.

Em especial, dedico esse trabalho à esposa **Roseli da Costa**, por ter sido companheira e incentivadora nessa caminhada, obrigado pelo amor e compreensão.

## RESUMO

Costa, Leandro Oliveira da. Elucidação do mecanismo de resistência de *Raphanus raphanistrum* L. e *Raphanus sativus* L. aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS). 101 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.

A produtividade agrícola e a sustentabilidade, especialmente em cereais de inverno, são essenciais para produzir alimento para o mundo. *Raphanus raphanistrum* L. e *Raphanus sativus* L., também conhecidas por nabo ou nabiça, são espécies cosmopolitas invasoras em diversas culturas agrícolas, causando prejuízos principalmente em lavouras de trigo, devido ter evoluído resistência aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS). A ALS é enzima chave envolvida na biossíntese de aminoácidos valina, leucina e isoleucina. A inibição da enzima ALS, causada pela ação de herbicidas, afeta a síntese de aminoácidos e, conseqüentemente, leva a morte da planta. Desvendar o mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS, em *R. raphanistrum* e *R. sativus* é importante para manejo racional da resistência e adoção de futuras tecnologias direcionadas a tal fim. Com o objetivo de elucidar o mecanismo de resistência e avaliar a herança da resistência em populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, aos herbicidas inibidores da ALS, realizou-se pesquisas no Brasil e Canadá. Populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus* oriundas de lavouras de trigo, do estado do Paraná e do Rio Grande do Sul, foram conduzidas em casa de vegetação e através de autopolinizações, levados a homozigose para a resistência. Plantas de três a quatro folhas, oriundas de sementes homozigotas, foram selecionadas para extração do DNA genômico e extração da enzima ALS. A partir do DNA extraído, realizou-se a amplificação do gene ALS. Os fragmentos do gene ALS foram purificados, sequenciados e comparados com seqüências de aminoácidos de *R. raphanistrum* já conhecidas na literatura. Também se realizou o teste de dose resposta em todas as populações de *Raphanus* spp., utilizando o herbicida metsulfurom-metil *in vivo*. Para determinar os parâmetros enzimáticos da enzima ALS *in vitro*, fez-se a extração da enzima e avaliou-se sua atividade na presença do herbicida imazapic e, a concentração de substrato (piruvato) que fornece velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação ( $K_M$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ). Utilizando plantas de três a quatro folhas, avaliou-se a presença ou não de resistência metabólica, pelo complexo citocromo P450 monooxigenase, através da utilização do herbicida metsulfurom-metil antecedido da aplicação de malation, sendo este último, inibidor da P450. Em experimento para avaliar herbicidas alternativos no controle de *Raphanus* spp. resistentes aos herbicidas inibidores da ALS e, possível resistência cruzada ou resistência múltipla, foram aplicados vários herbicidas, pertencentes a diferentes grupos químicos dos inibidores da ALS e herbicidas pertencentes a outros mecanismos de ação. A herança da resistência foi avaliada através de cruzamentos entre populações resistentes e suscetíveis, dentro de cada espécie. Utilizou-se o herbicida metsulfurom-metil como agente selecionador para o F1 resistente ou suscetível oriundo dos cruzamentos. O mecanismo de resistência em *R. raphanistrum* e *R. sativus* foi devido a mutação Trp-574-Leu no gene ALS. A dose resposta ao herbicida metsulfurom-metil confirmou a insensibilidade a este herbicida nas populações resistentes em estudo. As populações resistentes de *R. raphanistrum* e *R. sativus* demonstraram insensibilidade ao herbicida imazapic. Houve alteração nos parâmetros cinéticos da enzima ALS através do aumento no  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  nas populações resistentes comparadas as populações suscetíveis, nas duas espécies. Não há envolvimento do complexo citocromo P450

monooxigenase na resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS. *R. raphanistrum* e *R. sativus* possuem resistência cruzada aos herbicidas pertencentes aos grupos químicos sulfonilureias, imidazolinonas e triazolopirimidinas. Os herbicidas atrazina, 2,4-D, glifosato, saflufenacil, bentazona, flumioxazina, glufosinato de amônia e tembotriona são alternativas para o manejo da resistência nessas populações. A herança da resistência nas espécies *R. raphanistrum* e *R. sativus* é dominante e nuclear visto que não foi observado efeito materno na progênie.

Palavras-chave: 1. Citocromo P450 monooxigenase. 2. Dose-resposta. 3. Ensaio enzimático. 4. Herança da resistência. 5. Sequenciamento do DNA de nabo.



## ABSTRACT

Costa, Leandro Oliveira da. Elucidation of the resistance mechanism in *Raphanus raphanistrum* L. and *Raphanus sativus* L. to acetolactate synthase inhibitor herbicides. 101 f. Thesis (PhD in Agronomy) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.

The yield and sustainability of agricultural systems are essential for the world's food production, especially of winter cereals. *Raphanus raphanistrum* L. and *Raphanus sativus* L. (wild radish) are invasive cosmopolitan species found in several agricultural crops, damaging mainly wheat crops, because they developed resistance to herbicides that inhibit ALS (acetolactate-synthase). ALS is a key enzyme for the biosynthesis of the amino acids valine, leucine and isoleucine. The inhibition of the enzyme ALS by herbicides affects the synthesis of these amino acids and, consequently, leads to the death of the plant. The information on the mechanism of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *R. raphanistrum* and *R. sativus* is important for the rational management of this resistance and the development of new technologies for that. Thus, a research was carried out in Brazil and Canada to explain the mechanism of resistance and evaluate the inheritance of resistance of populations of *R. raphanistrum* and *R. sativus* to ALS-inhibiting herbicides. Populations of *R. raphanistrum* and *R. sativus* in wheat crops in the state of Paraná and Rio Grande do Sul, Brazil, were grown in a greenhouse using self-pollination, leading to homozygous resistance. Plants of three to four leaves from homozygous seeds were selected for genomic DNA extraction and ALS enzyme extraction. The ALS gene was amplified from the extracted DNA. The ALS gene fragments were purified, sequenced and compared to already known amino acid sequences of the *R. raphanistrum*. An in vivo dose-response test was also performed in all populations of *Raphanus* spp., using the metsulfuron-methyl herbicide. The enzymatic parameters of the enzyme ALS was determined in vitro. This enzyme was extracted and its activity in the presence of the imazapic herbicide, and the concentration of substrate (pyruvate) that provides initial velocity equal to half the maximum reaction rate ( $K_M$ ) and the maximum reaction rate ( $V_{max}$ ) were evaluated. The presence of metabolic resistance by the cytochrome P450 monooxygenase complex was evaluated in three- to four-leaf plants, using the metsulfuron-methyl herbicide preceded by the application of malathion, the latter being a P450 inhibitor. Several herbicides from different chemical groups of ALS inhibitors and herbicides with other mechanisms of action were used in an experiment to evaluate alternative herbicides in the control of *Raphanus* spp. resistant to ALS-inhibiting herbicides, and a possible cross-resistance or multiple resistance. The inheritance of resistance was assessed through crosses between resistant and susceptible populations within each species. The herbicide metsulfuron-methyl was used as selecting agent for resistant or susceptible F1 from these crosses. The mechanism of resistance in *R. raphanistrum* and *R. sativus* was due to the mutation Trp-574-Leu in the ALS gene. The dose-response test with the metsulfuron-methyl herbicide confirmed the insensitivity of the resistant populations to this herbicide. Resistant *R. raphanistrum* and *R. sativus* populations presented insensitivity to the herbicide imazapic. The kinetic parameters of the ALS enzyme with the increase in  $K_M$  and  $V_{max}$  in resistant populations was different that those of the susceptible populations, in both species. The cytochrome P450 monooxygenase complex has no involvement in the resistance of *R. raphanistrum* and *R. sativus* to ALS-inhibiting herbicides. *R. raphanistrum* and *R. sativus* present cross-resistance to herbicides from the chemical groups sulfonylureas,

imidazolinones and triazolopyrimidines. The herbicides atrazine, 2,4-D, glyphosate, saflufenacil, bentazone, flumioxazin, ammonium glufosinate and tembotrione are alternatives for the management of resistance in these populations. The inheritance of resistance in the species *R. raphanistrum* and *R. sativus* is dominant and nuclear, since no maternal effect was observed in the progeny.

Key words: 1. Cytochrome P450 monooxygenase. 2. Dose-response. 3. Enzymatic assay. 4. Inheritance of resistance. 5. Wild radish DNA sequencing.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I</b>	<b>27</b>
3.1	<i>Resumo</i>	27
3.2	<i>Introdução</i>	27
3.3	<i>Material e Métodos</i>	29
3.3.1	Material vegetal	29
3.3.2	Purificação das populações para homozigose da resistência	30
3.3.3	Extração do DNA, amplificação e sequenciamento do gene ALS	31
3.3.4	Curvas de dose-resposta	33
3.4	<i>Resultados e Discussão</i>	36
3.4.1	Identificação de mutações no gene ALS	36
3.4.2	Dose-resposta das populações de <i>R. raphanistrum</i> e <i>R. sativus</i> ao herbicida metsulfurometil	39
3.5	<i>Conclusões</i>	49
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>50</b>
4.1	<i>Resumo</i>	50
4.2	<i>Introdução</i>	51
4.3	<i>Material e Métodos</i>	53
4.3.1	Material vegetal	53
4.3.2	Extração da enzima ALS	54
4.3.3	Bioensaio “ <i>in vitro</i> ” com a enzima ALS	54
4.3.4	Metabolização do citocromo P <sub>450</sub> monooxigenase	57
4.4	<i>Resultados e Discussão</i>	58
4.4.1	Bioensaio “ <i>in vitro</i> ” da enzima ALS com o herbicida imazapic	58
4.4.2	Bioensaio “ <i>in vitro</i> ” da atividade enzimática da ALS	63
4.4.3	Metabolização do citocromo P <sub>450</sub> monooxigenase	66
4.5	<i>Conclusões</i>	69
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO III</b>	<b>70</b>
5.1	<i>Resumo</i>	70
5.2	<i>Introdução</i>	70

<i>5.3</i>	<i>Material e Métodos</i>	74
<i>5.4</i>	<i>Resultados e Discussão</i>	76
<i>5.5</i>	<i>Conclusões</i>	85
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Raphanus raphanistrum*, nome comum nabo ou nabiça, é espécie pertencente à família *Brassicaceae*, denominada genericamente de crucíferas, pois o arranjo de quatro pétalas formando a roseta floral tem a disposição de uma cruz. Originária da Europa Meridional, tornou-se espécie cosmopolita em regiões de clima temperado e subtropical de todo o mundo. *Raphanus sativus*, assim como *R. raphanistrum* também é conhecido por nabo ou nabiça, é espécie derivada de *R. raphanistrum* através da evolução e grande diversidade genética que há entre as espécies pertencentes a família *Brassicaceae*. Essas duas espécies possuem polinização cruzada, facilitando a hibridização entre ambas, não havendo diferenças citológicas e genéticas entre elas, conhecidas até o momento. O que diferencia *R. raphanistrum* de *R. sativus* são diversidades morfológicas como o formato da siliqua com presença de estrangulamento e constrições entre as sementes, no formato de lóbulo em *R. raphanistrum* e, siliqua na forma de cone, sem estrangulamento entre sementes em *R. sativus*.

Lavouras de cereais são as mais afetadas pela presença dessa espécie, que devido à alta prolificidade e competitividade, tornou-se planta daninha importante. *Raphanus* spp. são comuns em lavouras de inverno em regiões do Sul do Brasil. Essas espécies têm alta diversidade genética, o que facilita a adaptação em cultivos de verão como soja e milho. Além disso, através da pressão de seleção exercida pela aplicação de herbicidas inibidores da ALS, selecionou-se populações resistentes de *R. raphanistrum* e *R. sativus* a esse mecanismo de ação herbicida, tornando difícil o manejo dessas plantas daninhas em cultivos de cereais, tendo como principal razão, a baixa disponibilidade de moléculas herbicidas de outros mecanismos de ação com seletividade a essas culturas.

A produtividade agrícola e a sustentabilidade, especialmente para os principais cereais, são essenciais para alimentar a população humana global. Apenas grãos podem ser armazenados e transportados globalmente em quantidades que satisfaçam as

necessidades alimentares mundiais. Dos desafios para a segurança alimentar mundial, plantas daninhas em culturas são a maior ameaça biótica. Plantas daninhas infestam quase todos os tipos de cultivos e devem ser controladas para proteger as colheitas atuais e futuras. Nos últimos 50 anos, os herbicidas fizeram uma grande contribuição para o abastecimento mundial de alimentos, controlando de forma confiável e econômica as plantas daninhas. No entanto, as vantagens do uso de herbicidas resultaram em dependência excessiva dessa tecnologia. A seleção persistente através da aplicação desenfreada de herbicidas resultou inevitavelmente na evolução de populações de plantas daninhas resistentes (POWLES, 2014).

As plantas daninhas são o fator biótico mais importante que afeta a produção agrícola, elas são responsáveis por mais de 34% das perdas de produtividade das culturas em todo o mundo (OERKE, 2006). O controle de plantas daninhas com aplicação de herbicidas é considerado o método mais eficaz e eficiente em termos de custo e praticidade. A introdução de culturas geneticamente modificadas resultou em aumento significativo do uso de um mesmo herbicida e, como consequência, uma maior evolução de plantas daninhas resistentes (TRANEL; WRIGHT, 2002; POWLES; YU, 2010; GILBERT, 2013). A resistência, envolvendo sítio de ação alterado, é resultado normal e previsível imposta pela seleção por meio do uso de herbicidas. Existem mutações raras que conferem resistência a herbicidas em indivíduos, dentro de uma população de plantas daninhas, antes mesmo do uso dos herbicidas. Esses indivíduos portadores dessas mutações são selecionados através do uso repetido de herbicidas até um ponto em que a população de plantas daninhas já não é controlada na dose recomendada em condições normais (HEAP, 2014).

Os herbicidas possuem locais específicos de ligação primária nas plantas. Esses locais ou proteínas são denominados de sítio de ação. Os herbicidas atuam em rotas metabólicas das plantas, geralmente, inibindo a síntese de aminoácidos e proteínas nos cloroplastos, mas alguns herbicidas também atuam fora dos cloroplastos (POWLES; YU, 2010). Plantas daninhas resistentes podem sobreviver à aplicação do herbicida por meio de uma variedade de mecanismos e podem ser divididos em: sítio de ação alterado ou mecanismos que não envolvem alterações no sítio de ação do herbicida

(CHRISTOPHER; POWLES; HOLTUM, 1992; BECKIE; TARDIF, 2012; DÉLYE; JASIENIUK; Le CORRE, 2013). A compreensão dos fatores evolutivos ambientais ou antropogênicos que afetam a evolução da resistência a herbicidas em plantas é crucial para a compreensão dos mecanismos de resistência (BUSI et al., 2013).

Diante desse cenário, cresce a importância de investigação aprofundada em relação a resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS. Novas ferramentas para o manejo de plantas daninhas resistentes estão sendo estudadas (HOLLOMON, 2012; SHANER; BECKIE, 2014) e o sucesso dessas novas tecnologias dependerá do conhecimento aprofundado, tanto biológico como molecular, dos mecanismos de resistência de todas as espécies de plantas daninhas importantes para a agricultura. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi elucidar o mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores de ALS e indicar alternativas para o manejo químico no controle de populações resistentes de *R. raphanistrum* e *R. sativus* oriundos de diferentes regiões agrícolas do Sul do Brasil.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A espécie *Raphanus raphanistrum* L. é originária da Europa meridional, amplamente disseminada pelas regiões de clima temperado e subtropical do mundo. No Brasil ocorre com intensidade na Região Sul e em menor escala na região Centro Oeste. Pertence à família *Brassicaceae*. Planta herbácea, geralmente ereta, de caule ramificado, com altura variável, geralmente entre 60 a 110 cm. Durante a fase vegetativa a porção aérea do caule é pouco desenvolvida, ramificando-se intensivamente. Possui raiz pivotante, cilíndrica e engrossada (KISSMANN; GROTH, 1999, p. 535).

*Raphanus sativus* L., assim como *R. raphanistrum*, tem sua origem na Europa Meridional, tendo distribuição em regiões temperadas e subtropicais do mundo, sendo essas duas espécies conhecidas pelo nome comum de nabo ou nabiça. No Brasil, ocorrem cultivos de *R. sativus* var. *oleiferus* na forma de nabo forrageiro, usado principalmente na cobertura de solo. Formas selvagens de *R. sativus* ocorrem espontaneamente em lavouras como infestantes, especialmente em culturas de cereais de inverno, sendo mais comum na Região Sul do Brasil (KISSMANN; GROTH, 1999, p. 535).

Iniciada a fase reprodutiva, em *R. raphanistrum*, as ramificações alongam-se para apresentar em suas porções terminais as inflorescências. As folhas são alternadas, pecioladas e com o limbo profundamente recortado até atingir ou não à nervura. Florescência terminal do tipo cacho composto, constituído por numerosas ramificações as quais comportam grande número de flores. As flores são pedunculadas, cálice com quatro sépalas, corola com quatro pétalas amarelas ou raramente branca ou roxa, geralmente com nervuras escuras ou violáceas. Frutos do tipo síliqua e cilíndrica, com estrangulamento entre o alojamento das sementes que quando maduro se divide entre as articulações quebrando em unidades que contém as sementes. A semente é marrom avermelhada em forma oval (WARWICK; FRANCIS, 2005).



Estudos apontam que o número de cromossomos em *R. raphanistrum* é  $n = 9$  e  $2n = 18$  (KAMALA, 1983; WARWICK; FRANCIS, 2005). *R. sativus* também é uma espécie diploide,  $2n = 18$  (LI et al., 2010). No entanto, ao investigar populações selvagens de *R. raphanistrum*, oriundas da França e dos EUA, verificou-se que havia variação no número de cromossomos dentro de uma mesma população, variando entre  $2n = 16, 18, 17, 19$  e  $20$  (AL-MOUEMAR; DARMENCY, 2004). Dessa forma, *R. sativus* também pode não ser fixo, quanto ao número de cromossomos.

Ocorre confusão na classificação de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, onde existem diferenças entre as duas espécies que são pontos-chaves para identificá-las: *R. raphanistrum* possui frutos com notável estrangulamento entre o alojamento das sementes; *R. sativus* possui frutos atenuados para a parte apical, sem estrangulamento entre o alojamento das sementes (Figura 1) (LYSHEDE, 1982; KISSMANN; GROTH, 1999, p. 535; THEISEN, 2008). A chave de identificação é bem esclarecida por Warwick e Francis (2005) onde também mostra essas características de *R. raphanistrum* e *R. sativus* em relação a outras espécies do mesmo gênero. No entanto, a hibridização frequente entre *R. raphanistrum* e *R. sativus* causa maior complexibilidade morfológica em ambas as espécies.

Estudos genéticos conduzidos com *Raphanus* indicam que este gênero provavelmente seja um híbrido entre linhagens de mostardas, notadamente dos grupos *Brassica nigra* e *B. rapa oleracea*, originado em algum evento ocorrido a cerca de 5 milhões de anos. Estima-se também que *R. sativus* seja uma espécie derivada de *R. raphanistrum* (YANG, et al., 2002; YAMAGISHI; TERACHI, 2003; YAMANE; LÜ; OHNISHI, 2005; THEISEN, 2008). O primeiro mapa genômico de *Raphanus* foi desenvolvido baseado em um híbrido entre *Raphanus sativus* e *R. raphanistrum* (BETT; LYDIATE, 2003). As observações citológicas confirmaram o pareamento bivalente nesses híbridos, indicando alta homologia genética entre os nove cromossomos de *R. sativus* e *R. raphanistrum*. A segregação de loci codificado por RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) foi consistente com cromossomos altamente homólogos e, sugeriu a falta de uma barreira genética entre as duas espécies. Filogenias baseadas nos genes mitocondriais confirmaram *R. raphanistrum* como a espécie

progenitora mais provável que contribuiu para as múltiplas origens de nabo cultivado (*R. sativus*) (YAMAGISHI; TERACHI, 2003).

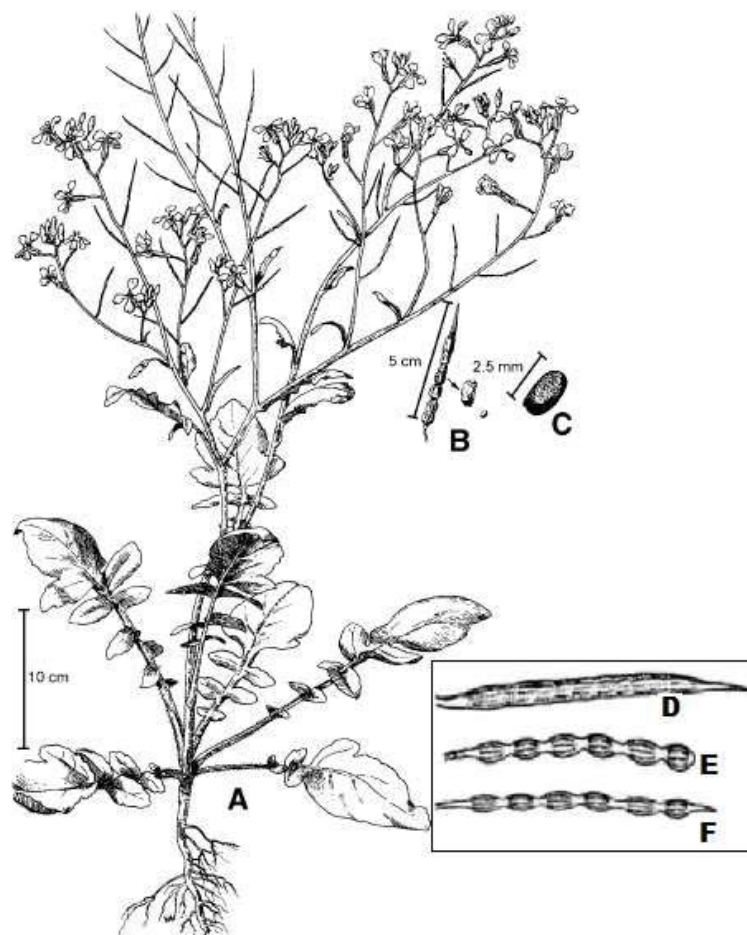


Figura 1 - *R. raphanistrum* L.: (A) forma da planta, (B) Frutos maduros e local onde rompe o segmento contendo a semente, (C) semente em forma oval, (D) forma da síliqua de *R. sativus*, (E e F) formas da síliqua de *R. raphanistrum* mostrando estrangulamento entre o compartimento das sementes. [Adaptado de Warwick e Francis (2005); Theisen (2008)].

A adaptação de espécies vegetais devido à grande diversidade genética pode resultar em diferenciação entre a espécie selvagem (planta daninha) e a espécie colonizadora. Oito populações de *R. raphanistrum*, oriundas de três continentes e nestes

coletadas em diferentes locais sendo duas delas consideradas populações originais, foram comparados oito loci microssatélite para diferenciação de traços quantitativos florais e diferenciação fenológica. O tamanho das pétalas foi o que divergiu mais do que o esperado. Mas a evolução no tempo de floração (precoce) e formação do botão floral foram as principais causas que permitiram que *R. raphanistrum* se tornasse planta daninha importante (SAHLI et al., 2008). Investigando híbridos oriundos da hibridização entre *R. raphanistrum* selvagem e *R. sativus* cultivado, verificou-se que as populações híbridas produziram pelo menos três vezes mais sementes do que as populações selvagens, impulsionada por maior emergência e precocidade de plântulas híbridas e maior taxa de sobrevivência. Esse trabalho mostrou que a hibridização pode aumentar o sucesso de adaptação e colonização em novos habitats em comparação com estudos anteriores (HOVICK et al., 2012).

A planta daninha de *R. raphanistrum* é extremamente bem-sucedida devido às suas características que incluem: germinação sob uma ampla gama de condições ambientais, ciclo de vida altamente flexível, prolífica produção de sementes e banco de sementes de longa duração. Em particular, há considerável diversidade genética dentro desta espécie de planta daninha, que permitiu o *R. raphanistrum* se adaptar em vários agroecossistemas (CHEAM; CODE, 1995; WALSH; OWEN; POWLES, 2007). Na Região Sul do Brasil ocorre com mais intensidade na época de inverno, sendo resistente a baixas temperaturas. O florescimento é estimulado por dias longos, e por isso que no inverno há maior desenvolvimento vegetativo (KISSMANN; GROTH, 1999, p. 535).

Por outro lado, devido apresentar crescimento rápido e elevada taxa de mineralização, *R. sativus* é considerada espécie de cobertura de solo importante nos sistemas agrícolas do Sul do Brasil, utilizada no período que antecede os cultivos de inverno e verão (AMADO; MIELNICZUK; AITA, 2002). Além disso, apresenta maior capacidade de supressão de plantas daninhas e descompactação de solo (BALBINOT Jr.; MORAES; BACKES, 2007). Entretanto, o nabo ou nabiça é uma das principais plantas daninhas dicotiledôneas dos cereais de inverno do Sul do Brasil, causando prejuízos consideráveis às culturas devido a sua elevada capacidade de competição, acarretando em

redução na produtividade (LAMEGO et al., 2004; VARGAS, ROMAN, 2005; RIGOLI et al., 2008).

O controle de plantas daninhas competitivas em áreas agrícolas faz-se necessário e o uso de herbicidas é uma das práticas eficientes (BUSI; VILLA-AIUB; POWLES, 2011). Os inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) perfazem mais de 30% dos herbicidas registrados para uso na agricultura mundial, sendo essenciais no controle de diversas plantas daninhas. Sua ampla utilização deve-se à reduzida toxicidade em mamíferos, ampla seletividade às culturas e elevada eficácia em baixas doses (YU et al., 2003; McCOURT et al., 2006; TAN; EVANS; SINGH, 2006; ENDO et al., 2013). Existe grande número de herbicidas comerciais inibidores da ALS, indicativo da importância para o controle de plantas daninhas, em um grande número de culturas (SHANER, 1999). Os herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) (sulfoniluréias, imidazolinonas e triazolpirimidinas) são amplamente utilizados para o controle de plantas daninhas em cereais e leguminosas, bem como em pastagens. Destacam-se nesses grupos, os herbicidas sulfoniluréias, no controle de dicotiledôneas, incluindo *R. raphanistrum* e *R. sativus* em lavouras de inverno (HASHEM et al., 2001a).

Heap (2017) definiu resistência de plantas daninhas a herbicidas como a habilidade de uma planta sobreviver e reproduzir, após exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para o biótipo suscetível da planta. Assim, a resistência não pode ser confundida com tolerância de plantas daninhas aos herbicidas. Christoffoleti e López-Ovejero (2008, p. 11) definiram tolerância como característica inata da espécie em sobreviver a aplicações de herbicidas na dose recomendada, que seriam letais a outras espécies, sem alterar o crescimento e desenvolvimento. É uma característica pré-existente na planta antes mesmo da primeira aplicação do herbicida.

Se o mesmo herbicida é usado no manejo de plantas daninhas durante diversos anos agrícolas, a seleção do biótipo resistente tem maior probabilidade de ocorrência. É comum nos sistemas de Monocultivo, de áreas extensivas, que certos herbicidas sejam preferencialmente aplicados no controle de plantas daninhas na cultura. O agricultor, muitas vezes, usa apenas um herbicida nas diversas safras agrícolas (POWLES; YU,

2010). Embora os herbicidas sejam ferramentas extremamente eficazes de manejo, a dependência excessiva a um único mecanismo de ação, resulta na seleção de populações de plantas daninhas resistentes. A resistência é, essencialmente, um fenômeno natural que ocorre espontaneamente em populações de plantas daninhas, mas só é notada quando ocorre a pressão de seleção através da aplicação de herbicidas pertencentes a um mesmo modo de ação (TRANEL; WRIGHT, 2002). É importante destacar que o herbicida é o agente selecionador do biótipo resistente através da pressão de seleção, não sendo, portanto, o agente mutagênico responsável pelo aparecimento dos genes mutantes que surgem na população por variabilidade genética natural (RIZZARDI et al., 2002).

Populações de *R. Raphanistrum*, no oeste da Austrália, evoluíram para a resistência a quatro mecanismos de ação (WALSH et al., 2004) aos herbicidas inibidores de ALS (WALSH; DUANE; POWLES, 2001), inibidores de fotossistema II (HASHIM et al., 2001b), mimetizadores de auxinas e inibidores da síntese de carotenóides (WALSH et al., 2004), resistência a glifosato, sendo este último, relatado pelos autores a suspeita do fluxo gênico oriundo de canola resistente ao glifosato (ASHWORTH, et al., 2014). Na África do Sul, evoluíram para resistência aos herbicidas inibidores da ALS (SMIT; CAIRNS, 2001) assim como, no Brasil (COSTA; RIZZARDI, 2014). Já *R. sativus* evoluiu para resistência aos herbicidas inibidores da ALS na Argentina, Chile e Brasil (THEISEN, 2008; PANDOLFO et al., 2013; HEAP, 2017).

No Brasil, desde o surgimento do primeiro caso de resistência de *Bidens pilosa* em 1993, já foram documentadas 28 espécies resistentes aos herbicidas ALS (HEAP, 2017). Entre essas espécies, Theisen (2008) documentou biótipos de *R. sativus* com resistência cruzada aos herbicidas clorimuron-etil, cloransulam-metil, imazetapir, metsulfurom-metil e nicosulfuron. Mais tarde, Costa e Rizzardi (2014) comprovaram resistência de *R. raphanistrum* ao herbicida metsulfurom-metil em populações oriundas de lavouras de trigo, no estado do Paraná.

Acetolactato sintase (ALS, EC 2.2.1.6) é a enzima chave envolvida na biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina). A inibição da enzima ALS irá afetar a síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada, com subsequente morte

da planta (TRANEL & WRIGHT, 2002). Até o momento, 158 espécies de plantas daninhas desenvolveram resistência aos herbicidas inibidores da ALS. A maior parte dos casos de resistência envolve mudança estrutural do sítio de ligação do herbicida ou superexpressão do gene. Já foram relatadas várias substituições de aminoácidos no gene ALS, dotando resistência a herbicidas em plantas daninhas: Ala122, Pro197, Ala205, Asp376, Arg377, Trp574, Ser653 e Gly654 (DÉLYE; JASIENIUK; Le CORRE, 2013; YU; POWLES, 2014; HEAP, 2017).

Polimorfismo de nucleotídeo único resultou em duas substituições de aminoácidos: uma única alteração de nucleotídeo CCT para ACT, levando a uma substituição Pro-197-Thr e, dupla alterações de nucleotídeos GCT para TAT, originando substituição de Ala-122-Tyr, causando elevada resistência de *R. raphanistrum* aos herbicidas inibidores da ALS (HAN et al., 2012) e, acumulação de duas substituições de aminoácido em códons diferentes com aumento do nível de resistência em comparação com uma única mutação (DÉLYE; JASIENIUK; Le CORRE, 2013). A substituição de aminoácidos específicos no gene da ALS confere níveis de resistência diferenciados aos herbicidas inibidores dessa enzima. A substituição Trp-574 para Leu resulta em altos níveis de resistência aos inibidores da ALS. Em contraste, substituições na Pro197 resultam em níveis elevados de resistência à sulfoniluréia e sulfonilamina e pouca ou nenhuma resistência aos herbicidas imidazolinona (TRANEL; WRIGHT, 2002; POWLES; YU, 2010).

Em população de *Lolium rigidum* na Austrália, resistente aos herbicidas inibidores da ALS, observou-se mutações no códon 197 de Pro197 para Ser, Thr ou Arg e no códon Trp-574 para Leu no gene ALS (YU et al., 2010; KAUNDUN; DALE; BAILLY, 2012). Mutações no gene ALS Pro-197-His e Pro-197-Tyr em *Descurainia sophia* e, Pro-197-Glu em *Myosoton aquaticum* foram documentadas e confere alto nível de resistência cruzada a esses herbicidas (LIU et al., 2015; DENG et al., 2017). *Bidens subalternans* resistente aos herbicidas ALS possuem três isoformas do gene ALS. A análise das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos indicou substituição de Trp-574-Leu (LAMEGO et al., 2009). Em *Descurainia sophia*, homozigota para a mutação Trp-574-Leu, o fator de resistência ao herbicida tribenuron-metil (SU) foi igual a 366 (DENG et

al., 2017). *Poa annua*, portando a mutação Trp-574-Leu, demonstrou resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos sulfoniluréias, imidazolinonas e pirimidiloxitibenzoatos (McELROY et al., 2013). *Conyza canadensis* foi resistente a três classes de herbicidas inibidores da ALS devido a substituição de Trp574 para Leu (MATZRAFI et al., 2015). *Amaranthus palmeri* revelou dois pontos de mutação que conferiu resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS: Ser 653 para Asn e Trp 574 para Leu (MOLIN, et al., 2016).

Em *Raphanus raphanistrum* L. e *Raphanus sativus* L. a mudança estrutural na acetolactato sintase é a forma comum de resistência aos herbicidas inibidores da ALS. As alterações dos aminoácidos Pro197 para Leu, Ala, His e Ser, Trp574 para Leu, Ala122 para Tyr e Asp376 para Glu já foram relatadas em *R. raphanistrum* como causas da resistência a herbicidas (TAN; MEDD, 2002; YU et al., 2003; HAN et al., 2012; YU et al., 2012). Em *R. sativus*, a mutação que confere resistência aos herbicidas inibidores da ALS, é a alteração do aminoácido Trp574 para Leu (PANDOLFO et al., 2016; CECHIN et al., 2017).

De maneira geral, espécies resistentes aos herbicidas inibidores da ALS apresentam mutação do gene que codifica a enzima, resultando em redução da sensibilidade desta aos herbicidas (TAN; MEDD, 2002; TRANEL; WRIGHT, 2002; WARWICK; SAUDER; BECKIE, 2005; HAN et al., 2012). Este mecanismo molecular, por envolver enzimas específicas, torna-se fácil de ser analisado (YUAN; TRANEL; STEWART, 2007). Sua identificação dá-se através de estudos de parâmetros enzimáticos da ALS (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009b). A presença de pontos de mutação no gene e a substituição específica de um aminoácido na enzima podem afetar a estrutura e a função da ALS, reduzindo sua atividade (YU et al., 2010; LI et al., 2013).

Muitos casos de resistência aos inibidores da enzima ALS, que envolve um único ponto de mutação no gene alvo, reduz a afinidade da enzima com o herbicida, reduzindo a habilidade do herbicida em interagir com o sitio de ação (LAMEGO et al., 2009; HAN et al., 2012; BURGOS et al., 2013). Maior parte dos estudos demonstra não haver mudanças drásticas na afinidade da enzima pelo substrato ( $K_M$ ) em biótipos resistentes,

mas pode haver mudanças na sensibilidade da enzima ALS à inibição por retroalimentação dos aminoácidos de cadeia ramificada, resultando em acúmulo desses aminoácidos (EBERLEIN et al., 1997; PRESTON et al., 2006; ASHIGH; TARDIF, 2007).

Poucos casos de resistência aos herbicidas inibidores da ALS são relatados tendo como principal mecanismo a não mudança estrutural do sítio alvo. A resistência não relacionada ao local de ação da enzima alvo pode ocorrer via redução da absorção, redução ou aumento da translocação e aumento da metabolização ou compartimentalização do herbicida (POWLES; YU, 2010; HAN et al., 2014). Esses mecanismos geralmente envolvem desintoxicação dos herbicidas pela glutathione S-transferase (GST) (TAL; HALL; STEPHENSON, 1995) ou complexo da citocromo P450 monooxygenase (CHRISTOPHER; POWLES; HOLTUM, 1992; HAN et al., 2013), absorção reduzida (KOGER; REDDY, 2005) ou redução da translocação na planta (FENG et al., 2004) e sequestro nos vacúolos (GE et al., 2010). Outras famílias de proteínas também podem estar envolvidas, como: proteínas transportadoras, glicosiltransferases, esterases, hidrolases, oxidases e peroxidases. Esse tipo de resistência também pode ser conferido por regulação gênica que codificam essas proteínas ou mudanças de aminoácidos que conferem maior capacidade de degradação do herbicida (YUAN; TRANEL; STEWART Jr., 2007; DÉLYE; JASIENIUK; Le CORRE, 2013; YU; POWLES, 2014).

A família de genes P450 codifica a classe mais versátil de enzimas envolvidas na desintoxicação da fase metabólica de herbicidas. Os P450 codificam os sistemas de enzimas dependentes de heme-proteína que normalmente catalisam reações de oxigênio e monooxigenação dependentes de NADPH. Os elétrons de NADPH são individualmente transferidos para os P450 através do citocromo P450 redutase. A variedade de reações mediadas por P450, incluindo hidroxilação, epoxidação, desalquilação, isomerização, descarboxilação e desaminação, resulta em produtos oxigenados, que normalmente são mais reativos ou mais solúveis, armando o cenário para reações de desintoxicação subsequentes. Alguns P450 podem metabolizar certos herbicidas podendo ser ainda inativado por conjugação em glicose, e subsequente transporte para o vacúolo



(SCHULER, 1996; YUAN; TRANEL; STEWART Jr., 2007; POWLES; YU, 2010; HAN et al., 2014).

Esse tipo de mecanismo de resistência parece ser uma resposta adaptativa mais geral do que em resistência devido a sítio de ação alterado. Resistência por sítio de ação não alterado pode ser constitutiva, estresse induzido e, eventualmente, podem ocorrer ambos (DÉLYE; JASIENIUK; Le CORRE, 2013). A variação genética na magnitude da resposta entre os indivíduos resulta na variação da sensibilidade, e esta é a base para a evolução de resistência por sítio de ação não alterado. Cruzamento entre populações de *Lolium rigidum*, resistentes a herbicidas do grupo ACCase e ALS devido a maior taxa de metabolização pelo P450, demonstrou que a seleção do herbicida pode facilmente resultar em acúmulo de genes de resistência dentro da população (BUSI; VILLA-AIUB; POWLES, 2011).

Na maioria das espécies, a resistência é nuclear, podendo atingir muitas plantas, e assim ser propagada mais depressa. Em espécies alógamas existe maior probabilidade de ocorrência de múltiplos mecanismos de resistência, pois a polinização cruzada permite maior recombinação gênica (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2008, p. 18). A diversidade genética é de fundamental importância no desenvolvimento da resistência, algumas espécies possuem mutações gênicas naturais, conferindo resistência a uma classe de herbicidas antes mesmo que ela seja aplicada no campo. Isso é possível por que essas mutações gênicas estão presentes aleatoriamente nas populações de plantas, sendo perceptível a partir da seleção realizada através da aplicação de um determinado herbicida. Muitas vezes a característica de resistência, ao ser disseminado através do pólen e das sementes, aumenta o fluxo gênico, conferindo resistência às áreas adjacentes (CHRISTOFFOLETI; FILHO; SILVA, 1994; MONQUEIRO; CHRISTOFFOLETI; DIAS, 2000).

Fatores ligados a genética e biologia da planta daninha tem papel importante na evolução da resistência a herbicidas. Estudos sobre a herança genética da resistência, causada por sítio de ação alterado, indicam que a resistência é controlada por um gene nuclear com grau variável de dominância (ASHIGH; RAJCAN; TARDIF, 2008; YU;

POWLES, 2014). Existem dois tipos de herança: a citoplasmática (materna) e a nuclear. Herança citoplasmática é aquela em que os caracteres hereditários são transmitidos via citoplasma; assim, somente a planta mãe transmitirá a resistência para os descendentes. Por outro lado, se a herança for nuclear, tanto o pai quanto a mãe podem transmiti-la (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001).

Estratégias de manejo químico para biótipos resistentes a herbicidas podem ser realizadas através do uso de herbicidas com diferentes mecanismos de ação ou através da associação de herbicidas com mecanismos distintos (POWLES; YU, 2010). No caso do *Raphanus* spp. resistentes, a antecipação da dessecação e o uso de herbicidas alternativos são ferramentas que podem melhorar o controle (THEISEN, 2008, COSTA; RIZZARDI, 2013; PANDOLFO et al., 2016). O manejo integrado de plantas daninhas, com associação de vários métodos de controle, é considerado eficaz no controle da resistência, além de evitar o surgimento e a seleção de novas espécies resistentes (OLIVEIRA NETO et. al., 2010; SHANER; BECKIE, 2014).

### 3 CAPÍTULO I

Base molecular da resistência aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) em *Raphanus raphanistrum* e *Raphanus sativus*.

#### 3.1 Resumo

Acetolactato sintase (ALS) é enzima chave envolvida na biossíntese de aminoácidos valina, leucina e isoleucina. A inibição da enzima ALS afeta a síntese desses aminoácidos e, conseqüentemente, ocorrerá morte da planta. Muitas espécies foram selecionadas para resistência aos herbicidas inibidores de ALS, sendo grande número de casos devido ao sítio de ação alterado, incluindo mudanças estruturais do sítio de ligação do herbicida. O objetivo foi identificar a base molecular da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em duas populações de *R. raphanistrum* e duas populações de *R. sativus* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS e, estabelecer se há diversidade no mecanismo de resistência. Além das populações resistentes, se trabalhou uma população suscetível dentro de cada espécie. Plantas de diferentes locais do Sul do Brasil foram coletadas, identificadas e passando por triagem com o herbicida metsulfurom metil, as plantas sobreviventes foram conduzidas em casa de vegetação e autopolinizadas para diminuir a heterozigose da resistência. Sementes de plantas autopolinizadas foram semeadas em vasos plásticos, e ao atingirem três a quatro folhas verdadeiras, selecionou-se dez plantas de cada população para fazer a extração do DNA. A amplificação do gene ALS foi realizada em PCR, a partir de *Primers* depositados no GenBank. Os fragmentos do gene ALS, amplificados no PCR, foram purificados e preparados para fazer o sequenciamento. Após o sequenciamento do gene ALS, as seqüências foram determinadas e comparadas com seqüências de aminoácidos de *Raphanus raphanistrum* depositados no GenBank. Também realizou-se experimento de curva dose-resposta, com plântulas oriundas de sementes de plantas autopolinizadas e, submetidas a doses crescente de metsulfurom-metil. Análise nucleotídica de partes importantes do gene ALS de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, demonstraram substituição do aminoácido triptofano, na posição 574 do gene ALS, pelo aminoácido leucina como principal causador de resistência aos herbicidas inibidores da ALS nessas duas espécies. O experimento de dose-resposta confirmou a insensibilidade ao herbicida metsulfurom-metil nessas populações resistentes.

Palavras-chave: 1. Dose-resposta. 2. Metsulfurom-metil. 3. Sequenciamento de DNA de nabiça.

#### 3.2 Introdução

As plantas daninhas são o fator biótico mais importante que afeta a produção agrícola, elas são responsáveis por mais de 34% das perdas de produtividade das culturas

em todo o mundo (OERKE, 2006). O controle de plantas daninhas com aplicação de herbicidas é considerado o método mais eficaz e eficiente em termos de custo e praticidade. A introdução de culturas geneticamente modificadas resultou em aumento significativo do uso de herbicidas e, como consequência, uma maior evolução de plantas daninhas resistentes (TRANEL; WRIGHT, 2002; POWLES; YU, 2010; GILBERT, 2013).

Acetolactato sintase (ALS, EC2.2.1.6) é uma enzima chave envolvida na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. A inibição da enzima ALS irá afetar a síntese desses aminoácidos, com subsequente morte da planta. Esses herbicidas são amplamente utilizados devido à baixa taxa de dose, baixa toxicidade em mamíferos, seletividade a grande número de culturas e alta eficácia. Existe elevado número de herbicidas comerciais inibidores da ALS, indicativo da importância para o controle de plantas daninhas, em um grande número de culturas. Em todo o mundo há 54 princípios ativos inibidores de ALS registrados como herbicidas, pertencentes a 5 grupos químicos: sulfoniluréias, triazolpirimidinas, imidazolinonas, pirimidilbenzoatos e sulfonilaminocarboniltriazolinona (SHANER, 1999; TRANEL; WRIGHT, 2002; HEAP, 2017).

Até o momento, foram selecionadas 158 espécies de plantas daninhas com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. A maior parte dos casos é devido ao sítio de ação alterado. Já foram relatadas várias substituições de aminoácidos no gene ALS, dotando resistência a herbicidas em plantas daninhas: Ala-122, Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377, Trp-574, Ser-653 e Gly-654 (DÉLYE; JASIENIUK; Le CORRE, 2013; YU; POWLES, 2014; HEAP, 2017). Em *Raphanus raphanistrum* L. e *Raphanus sativus* L. a mudança estrutural na acetolactato sintase é a forma comum de resistência aos herbicidas inibidores da ALS. As alterações dos aminoácidos Pro-197 para Leu, Ala, His e Ser, Trp-574 para Leu, Ala-122 para Tyr e Asp-376 para Glu já foram relatadas em *R. raphanistrum* como causas da resistência a herbicidas (TAN; MEDD, 2002; YU et al., 2003; HAN et al., 2012; YU et al., 2012). Em *R. sativus*, a mutação que confere resistência aos herbicidas inibidores da ALS, é a alteração do aminoácido Trp-574 para Leu (PANDOLFO et al., 2016).

Essas duas espécies de *Raphanus* são plantas daninhas de distribuição global, altamente competitivas, principalmente em culturas de inverno, sendo o controle químico realizado basicamente com herbicidas inibidores da ALS e, frequentemente, relatado resistência a esses herbicidas (HASHM et al., 2001a; WALSH; DUANE; POWLES, 2001; PANDOLFO et al., 2013). No Sul do Brasil, *R. raphanistrum* e *R. sativus* são plantas daninhas de extrema importância, pois são espécies presentes em todas as regiões onde são cultivados cereais de inverno, mostrando-se também adaptadas em cultivos de verão. Há populações resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, onde, todos os casos relatados indicam haver resistência cruzada a esses herbicidas (THEISEN, 2008; COSTA; RIZZARDI, 2014).

Diante disso, levantou-se as seguintes hipóteses: a resistência em *R. raphanistrum* e *R. sativus* é devido a mutações no gene ALS? Ocorre a mesma mutação em todas as populações? pois já havia diferenças significativas na dose resposta ao herbicida metsulfurom-metil entre as populações, em testes preliminares. As mutações seriam as mesmas ou diferem daquelas citadas na literatura para os herbicidas ALS? Com isso, o objetivo do estudo foi identificar a base molecular da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em duas populações de *R. raphanistrum* e, duas populações de *R. sativus* oriundas de diferentes locais do Sul do Brasil e, estabelecer se há diversidade no mecanismo de resistência entre as espécies e populações e comparar com as já citadas em literatura. Além disso, avaliar se há variações significativas, em relação a dose-resposta ao herbicida metsulfurom-metil, entre as populações.

### **3.3 Material e Métodos**

#### **3.3.1 Material vegetal**

Este estudo utilizou três populações de *R. raphanistrum* e três populações de *R. sativus* oriundas de diferentes locais do Sul do Brasil (Tabela 1). Após coleta das sementes, de plantas oriundas de áreas com relatos de falhas de controle ao ser utilizado herbicidas ALS, as mesmas foram semeadas em casa de vegetação para ser realizado o pré-teste com o herbicida metsulfurom-metil (Ally®). Ao atingirem 3 a 4 folhas, as plantas

foram tratadas com o herbicida na dose recomendada (2,4 g i.a. ha<sup>-1</sup>). A partir de plantas sobreviventes foram colhidas sementes e semeadas novamente para a realização do teste de dose-resposta preliminar (Dados não apresentados). A população HR<sub>Rr1</sub> foi utilizada na comprovação da resistência de *R. raphanistrum* aos herbicidas inibidores da ALS por Costa e Rizzardi (2014).

Tabela 1 - Localização das populações de *Raphanus raphanistrum* e *R. sativus*, resistente (HR) e suscetível (HS) aos herbicidas inibidores da ALS, utilizadas no estudo

População <i>R. raphanistrum</i>	Status da resistência	Município	Latitude	Longitude
HR <sub>Rr1</sub>	HR	Cafelândia-PR	24°39'58''	53°19'55''
HR <sub>Rr2</sub>	HR	Cafelândia-PR	24°41'01''	53°21'00''
HS <sub>Rr3</sub>	HS	Cafelândia-PR	24°38'45''	53°18'53''
População <i>R. sativus</i>				
HR <sub>Rs1</sub>	HR	Cruz Alta-RS	28°54'21''	53°59'05''
HR <sub>Rs2</sub>	HR	Júlio de Castilhos-RS	29°27'22''	53°54'48''
HS <sub>Rs3</sub>	HS	Júlio de Castilhos-RS	29°22'62''	53°65'72''.

Para compor as populações testemunha (susceptível ao herbicida), coletou-se plantas em áreas sem histórico de aplicação de herbicidas inibidores da ALS, compondo duas populações, sendo uma de *R. sativus* e outra de *R. raphanistrum*. As populações foram conduzidas em casa de vegetação, em vasos plásticos de 17 cm de diâmetro e 14 cm de altura, com capacidade volumétrica de 2,5 L, perfazendo área superficial de 0,0453 m<sup>2</sup>. Os mesmos foram preenchidos com mistura de solo mais substrato comercial do tipo Turfa Fértil<sup>®</sup> em proporção 3:1.

### 3.3.2 Purificação das populações para homozigose da resistência

*Raphanus* spp. são plantas de polinização aberta, geralmente feita por insetos, o que as torna heterozigotas. Para o sequenciamento do gene da ALS é importante que as plantas estejam próximas da homozigose para a resistência, tornando-as mais fácil a identificação das mutações existentes no gene ALS (YU et al., 2012). Para isso, realizou-

se autopolinização artificial dentro de cada população, realizando-se o isolamento das flores por meio de sacos antipólen para evitar polinização cruzada e, quando confirmada a fecundação, retirou-se o saco e fez-se a identificação de cada siliqua. Manteve-se identificada toda a progênie de cada planta dentro de cada população, repetindo por quatro vezes a autopolinização, exceto na população HR<sub>Rs1</sub>. Na população HR<sub>Rs1</sub> foram realizadas duas autopolinizações devido esta ser recebida para trabalho após as demais. A cada geração, as progênies resistentes foram submetidas à seleção através da aplicação do herbicida metsulfurom-metil, na dose descrita anteriormente. Para as populações suscetíveis, separou-se uma planta oriunda de cada siliqua e aplicou-se o herbicida para verificar a suscetibilidade. Estas populações foram utilizadas para realizar os testes de dose-resposta, extração da enzima ALS e sequenciamento do gene ALS.

### 3.3.3 Extração do DNA, amplificação e sequenciamento do gene ALS

Para realizar o sequenciamento do gene da ALS e, verificar possíveis alterações na sequência de aminoácidos, foi realizado experimento em laboratório pertencente ao AAFC (Agriculture and AgriFood Canada), (ORDC) Ottawa Research and Development Centre, em Ottawa- Ontário- CA, no período de maio de 2015 a janeiro de 2016. Sementes de plantas autopolinizadas (conforme descrito anteriormente) foram semeadas em vasos plásticos contendo mistura de solo e fibra de coco, em casa de vegetação, e ao atingirem três a quatro folhas verdadeiras, selecionou-se dez plantas de cada população para a retirada de tecido foliar e, conseqüentemente, fazer a extração do DNA.

O DNA foi extraído a partir de 10 g de tecido foliar sem pecíolo, de cada planta, congelado em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), maceradas em almofariz, utilizando o kit Bio 101 Fast DNA<sup>®</sup>, seguindo as instruções do fabricante. Após isso, as amostras contendo o DNA foram quantificadas utilizando Nanodrop, para posteriormente fazer a amplificação com os primers. A amplificação do gene ALS foi realizada em PCR (Polymerase Chain Reaction), com *Primers* descritos em Tan e Medd (2002) e Han et al. (2012) depositados no Banco de Genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tabela

2). Esses Primers amplificam e sequenciam fragmentos do gene ALS que contém cinco regiões altamente conservadas (Dominios A, B, C, D e E) (McNAUGHTON et al., 2005).

Tabela 2 - Primers utilizados para sequenciamento do gene ALS em populações de *Raphanus sativus* L. e *Raphanus raphanistrum* L. suscetíveis (HS<sub>Rr3</sub> e HS<sub>Rs3</sub>) e resistentes (HR<sub>Rr1</sub>, HR<sub>Rr2</sub>, HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) aos herbicidas inibidores da ALS

Primer <sup>1</sup>	Sequencia 5'-3'
WR122F	TCTCCCGATACGCTCCCGACG
WR653R	TCAGTACTTAGTGCAGACCATC
WR205R	GCAAGCTGCTGCTGAATATCC
WR376F	TTGCGAGTACTTTGATGGGG
WR574F	TTGTCATCATCAGGCCTTGGA
WR376R	GCTTCTGCTCGCTCAATTCAC

<sup>1</sup> Primers citados em Tan e Medd (2002); Han et al. (2012) e Yu et al. (2012).

Para amplificar os ~1758 pares de base, que contempla as cinco regiões altamente conservadas do gene ALS, utilizou-se os primers WR122F e WR653. Para essa reação utilizou-se: 11,4 µL de dH<sub>2</sub>O (água isenta de nucleasse); 4 µL de Buffer 5X; 0,4 µL de Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs); 1 µL de primers forward (F) (3,2 µM); 1 µL de primer reverse (R) (3,2 µM); 0,2 µL de Phusion DNA Polymerases e 2 µL de DNA de cada população (~10 ng ul<sup>-1</sup>), totalizando volume final de 20 µL. Para a performance do PCR Mastercycler epGradient procedeu-se da seguinte forma: 30 segundos a 98 °C; 40 ciclos a 98 °C por 30 segundos, 64 °C por 30 segundos e a 72 °C por 30 segundos; 10 minutos a 72 °C e finalizou com 4 °C. Os fragmentos do gene ALS, amplificados no PCR, foram purificados em E-Gel<sup>®</sup> iBase<sup>™</sup>, com CloneWell<sup>™</sup> Agarose Gel 0,8%.

Para realizar o sequenciamento, utilizou-se o Kit ABI BigDye<sup>™</sup> Terminator reagent v. 3.1 (PE Corporation, PE Biosystems, Foster City, CA). A reação de sequenciamento foi realizada com: 8 µL de Bigdye Terminator 1:8; 0,5 µL dos demais primers não utilizados anteriormente (3,2 µM); 2 µL do produto PCR (~50 ng ul<sup>-1</sup>), totalizando volume final de 10,5 µL. A reação PCR se deu da seguinte forma: 1 minuto a 96 °C; 25 ciclos a 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e a 60 °C por 4 min e



finalizou com 4 °C. O produto PCR foi sequenciado com ABI 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequências foram determinadas e comparadas usando Sequencher software v 4.7 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Polimorfismos ou heterozigosidade de nucleotídeos baseou-se no aparecimento de dois picos em uma única posição nucleotídica nos cromatogramas. Os aminoácidos e as posições de nucleotídeos foram numerados com base na sequência de aminoácidos de *Raphanus raphanistrum* depositados no GenBank (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequências e mudanças de nucleotídeos conhecidas no gene ALS que propiciam resistência aos herbicidas inibidores da ALS

Dominio (Posição)	Sequencia 5' – 3'	Mudança para
C (Ala122)	GTC TTC GCT TAC CCA GGA GGC <b>GCN</b> TCC ATG GAG ATC CAC CAG GCC TTG ACT CGC TCC	Thr (ACN)
A (Pro197)	GCT ATT ACA GGA CAG GTC <b>(A/G)CT</b> CGT CGG ATG ATC GGT ACC	Thr (CAN), Ala (GCN) His (CAT), Ser (TCT), Gln (GGN), Leu (CTN)
D (Ala205)	<b>GCN</b> TTC CAG GAG ACG CCC	Val (GTN)
Asp 376	AGG TTT <b>GAT GAC</b> CGT GTC	Glu (GAA GAG)
B (Trp574)	CAA <b>TGG</b> GAA GAT	Leu (TTG)
E (Ser 653)	ATC CCA <b>AGT/C</b> GGT GGC	Thr (ACC) or Asp (AAT/C)

Fonte: Tan e Medd (2002); Han et al. (2012); Yu et al. (2012).

### 3.3.4 Curvas de dose-resposta

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV-UPF), na cidade de Passo Fundo-RS, no período de junho a agosto de 2016.

As unidades experimentais consistiram de vasos plásticos de 17 cm de diâmetro e 14 cm de altura, com capacidade volumétrica de 2,5 L, perfazendo área superficial de 0,0453 m<sup>2</sup>, preenchidos com substrato comercial do tipo Turfa Fértil®. As sementes foram germinadas em bandejas de isopor e, posteriormente, transplantadas três plântulas

por vaso, mantendo-os com irrigação intermitente. Quando a maioria das plantas atingiram o estágio de desenvolvimento de três a quatro folhas verdadeiras, os vasos foram retirados da casa de vegetação para aplicação do herbicida metsulfurom-metílico (Ally®), herbicida do grupo químico sulfoniluréias pertencente ao mecanismo de ação inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). A aplicação foi realizada com pulverizador costal de precisão, pontas jato plano XR 11002, na altura de 50 cm acima do alvo com volume de aplicação de 200 L ha<sup>-1</sup>. Após a aplicação do herbicida, os vasos foram levados para a casa de vegetação e permaneceram sem irrigação por 24 horas a fim de não interferir na absorção do herbicida.

Os tratamentos foram resultados da combinação de populações resistentes e populações suscetíveis com 10 doses múltiplas da dose comercial do herbicida metsulfurom-metil (0 D; 0,25 D; 0,5 D; 1 D; 2 D; 4 D; 8 D; 16 D; 32 D e 64 D), em que D é a dose comercial recomendada para controle de *R. raphanistrum* (2,4 g i.a. ha<sup>-1</sup>). Assim as doses que constituíram os tratamentos foram: 0,0; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8; 9,6; 19,2; 38,4; 76,8 e 153,6 g i.a. ha<sup>-1</sup>. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições.

Avaliou-se visualmente o controle imposto pelo herbicida aos 14 e 35 dias após aplicação (DAA). Utilizou-se como base a escala percentual, em que a nota 0% correspondeu a nenhum efeito do herbicida e a nota 100% significou morte completa das plantas. Avaliações de matéria seca da parte aérea (MSPA) foram realizadas, cortando-se rente ao solo, todas as plantas do vaso aos 35 DAA e, posteriormente, secadas em estufa a 65 °C por 72 horas até peso constante, quando foi realizada a quantificação da MSPA em balança de precisão. Os resultados de controle e MSPA foram inicialmente submetidos à análise de variância e quando significativa, empregou-se regressão, utilizando-se modelos não lineares de ajuste da curva de dose-resposta. Para o ajuste da curva dos dados de controle, utilizou-se o modelo log-logístico de quatro parâmetros (Equação 1) (STREIBIG, 1988; SEEFELDT; JENSEN; FUERTS, 1995).

$$y = a + \frac{b}{\left[1 + \left(\frac{x}{c}\right)^d\right]}$$

Equação 1-  $y$  = porcentagem de controle;  $x$  = coeficiente da dose D; e  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  = coeficientes da curva, de modo que  $a$  é o limite inferior da curva,  $b$  é a diferença entre o ponto máximo e o mínimo da curva,  $c$  é o coeficiente da dose D que proporciona 50% de resposta da variável dependente e  $d$  é a declividade da curva ao redor de  $c$ .

Os dados de MSPA foram transformados para valores percentuais, partindo-se do princípio de que as parcelas que permaneceram sem aplicação de herbicida possuem 100% de MSPA e as demais possuem percentuais desta biomassa, em consequência da redução imposta pelo produto. Para o ajuste da curva de MS utilizou-se o modelo exponencial declínio duplo de quatro parâmetros (Equação 2) (YOSHIMURA; BECKIE; MATSUO, 2006; BECKIE; WARWICK; SAUDER, 2012b). A escolha dos modelos deu-se através da prioridade ao que mais se ajustou aos resultados.

$$y = ae^{-bx} + ce^{-dx}$$

Equação 2-  $y$  = % de controle em relação a parcela não tratada,  $x$  é o coeficiente de dose do herbicida (g i.a. ha<sup>-1</sup>),  $a$  é o limite inferior,  $a + c$  é o limite superior da curva,  $b$  e  $d$  quantificam a inclinação da curva.

Todas as análises estatísticas de regressão não linear foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SIGMA PLOT 12.5. No modelo log-logístico os termos integrantes da equação (c) é uma estimativa do valor de GR50 (CHRISTOFFOLETI, 2002). A partir das curvas geradas, calculou-se o valor de DL<sub>50</sub> ou GR<sub>50</sub> em g i.a. ha<sup>-1</sup>.

O DL<sub>50</sub> ou GR<sub>50</sub> é a dose necessária para obter controle de 50% ou para reduzir a MSPA da planta em 50% em relação as plantas não tratadas de populações resistentes e suscetíveis. De posse dos valores da DL<sub>50</sub> ou GR<sub>50</sub>, obteve-se o Fator de Resistência (F), que correspondeu à razão entre a GR<sub>50</sub> ou DL<sub>50</sub> da população resistente em relação a DL<sub>50</sub> ou GR<sub>50</sub> da população suscetível. O fator F (F=R/S) expressa o número de vezes em que a dose necessária para controlar 50% da população resistente é superior à dose que controla 50% da população suscetível (BURGOS, 2015).

### 3.4 Resultados e Discussão

#### 3.4.1 Identificação de mutações no gene ALS

Para comparar a base molecular da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em *R. raphanistrum* e *R. sativus*, as regiões do gene ALS altamente conservadas, abrangendo os locais potenciais de mutações foram amplificadas, sequenciadas e comparadas entre as populações suscetíveis e resistentes (Tabela 4). A amplificação do DNA genômico, com os primers listados na Tabela 2, produziu um fragmento de DNA de aproximadamente 1686 pares de bases que abrange todas as regiões A, B, C, D e E onde acontecem maioria das modificações de aminoácidos que são importantes para a base da resistência no gene ALS (BOUTSALIS; KAROTAM; POWLES, 1999; TAN; MEDD, 2002; TRANEL; WRIGHT; HEAP, 2017).

O sequenciamento parcial do gene ALS de *R. raphanistrum* e *R. sativus* demonstrou que, nas populações resistentes, a base guanina (G) foi substituída por uma timina (T). Essa mudança de base configura mutação de Triptofano na posição 574 para Leucina (Trp-574-Leu) no gene ALS. As demais substituições mutagênicas estudadas nesse trabalho, conhecidas na literatura por ocasionar resistência a esses herbicidas no gene ALS, não foram encontradas em nenhuma das populações (Tabela 4). A mutação Trp-574-Leu no domínio B do gene ALS é conhecida por causar resistência a todos os grupos químicos dos herbicidas inibidores da enzima ALS, ou seja, as sulfoniluréias (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), pirimidinilbenzoatos (PB) e sulfonilaminocarbonil-triazolinonas (SCT). Essa mutação já foi identificada em várias espécies de plantas daninhas resistentes (POWLES; YU, 2010; YU; POWLES, 2014), incluindo *R. raphanistrum* (TAN; MEDD, 2002; YU et al., 2003; HAN et al., 2012; YU et al., 2012; HEAP, 2017) e *R. sativus* (PANDOLFO et al., 2016).

Fragmentos do gene ALS, sequenciados nesse trabalho, também demonstraram algumas mutações não conhecidas na literatura por causar resistência à herbicidas inibidores da ALS. Dentre essas, a mutação Ala-360-Ser chamou atenção por estar presente em todas as amostras resistentes, exceto na população HR<sub>R<sub>s</sub>1</sub> e nas populações

suscetíveis. Levanta-se a hipótese que Ala-360-Ser poderia ser uma nova mutação e estar associada a resistência a esses herbicidas. Sabe-se também que muitas mutações ocorrem normalmente no gene ALS sem causar qualquer problema à planta ou estar associada a resistência a herbicidas. Tan e Medd (2002) observaram 74 mutações no gene ALS de *R. raphanistrum*, sendo que nenhuma delas estava, de forma direta, associada com a resistência aos herbicidas inibidores da ALS. Pode haver combinação de mais de uma mutação ou recombinação intragênica dentro de um mesmo indivíduo, sabendo-se que as probabilidades de acontecer são baixas (YU; POWLES, 2014). Em *Lolium rigidum*, por exemplo, biótipos resistentes homozigóticos para a mutação Thr-197-Ser também foram heterozigotos para a mutação Trp-574-Leu. Isso pode ser atribuído a polinização cruzada da espécie e, conseqüentemente, acúmulo de alelos mutantes (KAUNDUN; DALE; BAILLY, 2012).

Tabela 4- Sequências parciais de nucleotídeos do gene ALS de *Raphanus raphanistrum* e *Raphanus sativus*, resistentes (HR<sub>Rf1</sub>, HR<sub>Rf2</sub>, HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e suscetíveis (HS<sub>Rf3</sub> e HS<sub>Rs3</sub>) aos herbicidas inibidores da ALS, demonstrando mudanças de aminoácidos causando resistência a esses herbicidas

População	Sequência nucleotídica 5'-3'						
	Ala 122 <sup>1</sup>	Pro 197	Ala 205	Ala 360 <sup>2</sup>	Asp 376	Trp 574	Ser 653
HR <sub>Rf1</sub>	GCT	CCT	GCG	<b>TCT- Ser</b>	GAT	<b>TTG-Leu<sup>3</sup></b>	AGT
HR <sub>Rf2</sub>	GCT	CCT	GCG	<b>TCT- Ser</b>	GAT	<b>TTG-Leu</b>	AGT
HS <sub>Rf3</sub>	GCT	CCT	GCG	GCT	GAT	TGG	AGT
HR <sub>Rs1</sub>	GCT	CCT	GCG	GCT	GAT	<b>TTG-Leu</b>	AGT
HR <sub>Rs2</sub>	GCT	CCT	GCG	<b>TCT- Ser</b>	GAT	<b>TTG-Leu</b>	AGT
HS <sub>Rs3</sub>	GCT	CCT	GCG	GCT	GAT	TGG	AGT

<sup>1</sup> Posição do aminoácido no gene ALS. <sup>2</sup> Mutação não conhecida como causa de resistência a herbicidas inibidores da ALS. <sup>3</sup> Mutação diagnosticada. Leu= Leucina, Ala= Alanina, Pro= Prolina, Asp= ácido aspártico, Trp= Triptofano.

No cromatograma do sequenciamento parcial do gene ALS, é possível observar os picos onde ocorreu a substituição da base G, presente nas populações suscetíveis, pela base T, presente nas populações resistentes, o que caracteriza a mutação Trp-574-Leu. A

homozigose para a mutação Trp-574-Leu, nesses fragmentos do gene ALS, é demonstrada pela intensidade do pico cromatográfico em cada nucleotídeo (Figura 2).

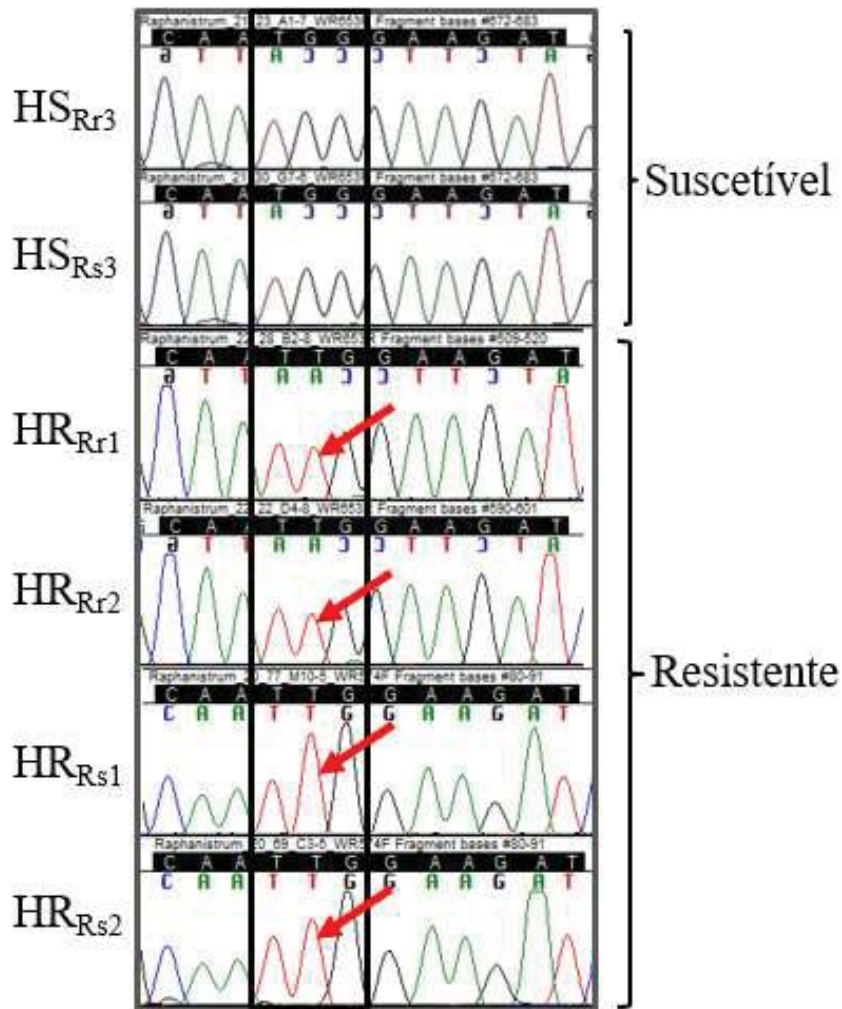


Figura 2 - Cromatograma com parte do sequenciamento nucleotídico do gene ALS de *Raphanus raphanistrum* e *Raphanus sativus*, resistentes (HR<sub>Rr1</sub>, HR<sub>Rr2</sub>, HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e suscetíveis (HS<sub>Rr3</sub> e HS<sub>Rs3</sub>) aos herbicidas inibidores da ALS.

Algumas das plantas sequenciadas demonstraram heterozigose em partes do gene quando comparadas pelo cromatograma. Isso acontece por que, tanto *R. raphanistrum* quanto *R. sativus*, são plantas que tem alta porcentagem de polinização cruzada

(WARWICK; FRANCIS, 2005; HAN et al., 2012; YU et al., 2012). O pico cromatográfico da população HR<sub>Rs1</sub> demonstrou maior intensidade. Isso se repetiu em maioria das plantas pertencentes a essa população, podendo estar relacionado ao maior grau de homozigose para a mutação Trp-574-Leu.

### **3.4.2 Dose-resposta das populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus* ao herbicida metsulfurom-metil**

A análise de variância foi significativa para todas as variáveis analisadas com interação significativa dos fatores populações e doses para controle aos 14 e 35 dias após a aplicação (DAA) e matéria seca (MS) aos 35 DAA. Os dados de resposta ao herbicida foram tabulados separados graficamente entre *R. raphanistrum* e *R. sativus* e ajustaram-se aos modelos não lineares, sendo que, os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) variaram de 0,96 a 0,99. Na avaliação visual de *R. raphanistrum*, aos 14 DAA, obteve-se controle próximo a 100% da população suscetível (HS<sub>Rr3</sub>) na dose recomendada (2,4 g i. a. ha<sup>-1</sup>). Já as duas populações resistentes, para chegar em 50% de controle, foi necessário 8 vezes a dose recomendada de metsulfurom-metil, ao passo que na maior dose utilizada, obteve-se 78% (HR<sub>Rr1</sub>) e 75% (HR<sub>Rr2</sub>) de controle respectivamente (Figura 3). As populações resistentes não diferiram em relação a resposta de controle e doses do herbicida.

Para *R. sativus*, a população suscetível (HS<sub>Rs3</sub>), alcançou 90% de controle aos 14 DAA, com a dose recomendada. Para as populações resistentes (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>), houve diferenças estatísticas quando utilizado doses mais altas do herbicida, em relação a controle. Na população HR<sub>Rs2</sub> foram necessárias 8 vezes a dose recomendada para chegar próximo de 50% de controle, enquanto na população HR<sub>Rs1</sub>, com essa mesma dose, obteve-se apenas 20% de controle. Nenhuma das populações atingiu 80% de controle na maior dose utilizada (Figura 4). Esses dados mostram diferenças na resposta ao herbicida metsulfurom-metil entre as duas populações resistentes de *R. sativus*.

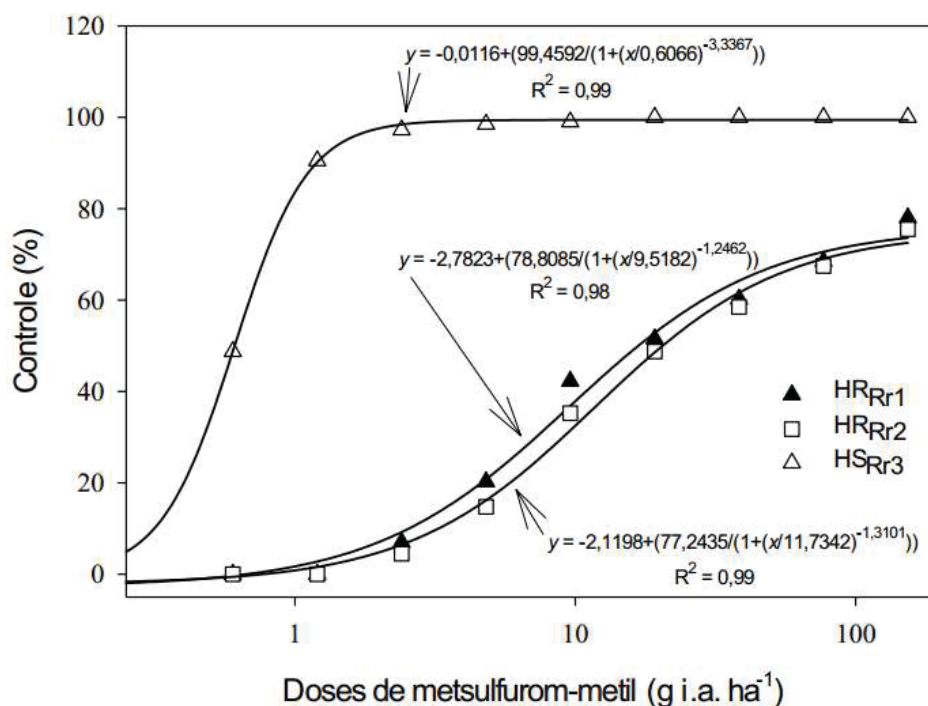


Figura 3 - Controle visual (%) e parâmetros da equação aos 14 dias após aplicação (DAA) de diferentes doses do herbicida metsulfurom-metil em três populações de *R. raphanistrum*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>Rr1</sub> e HR<sub>Rr2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>Rr3</sub>).

Aos 30 DAA do herbicida, a população suscetível de *R. raphanistrum* chegou a 100% de controle visual, na dose recomendada. Já as populações resistentes diferiram significativamente entre si, destacando-se a população HR<sub>Rr2</sub>, tendo ação do herbicida menor que na população HR<sub>Rr1</sub> (Figura 5). Nessa etapa de avaliação, observou-se na população HR<sub>Rr1</sub> algumas plantas com menor grau de resistência em uma mesma dosagem do herbicida, quando utilizado doses elevadas. Isso provocou redução acentuada no porte dessas plantas, atingindo 50% de controle ao utilizar o dobro da dose recomendada do herbicida. Costa e Rizzardí (2014) trabalhando com essa mesma população, heterozogota e mesma dosagem de metsulfurom-metil, o biótipo resistente demonstrou insensibilidade ao herbicida. Esse aumento de suscetibilidade pode estar associado à depressão endogâmica devido a homozigose a qual foi submetida a população.



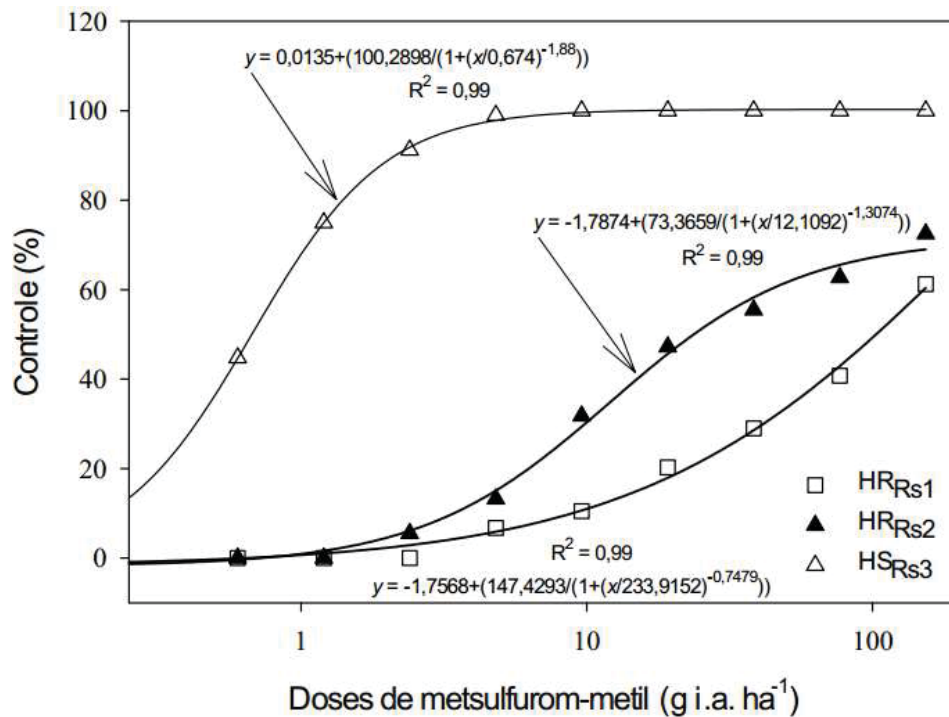


Figura 4 - Controle visual (%) e parâmetros da equação aos 14 dias após aplicação (DAA) de diferentes doses do herbicida metsulfurom-metil em três populações de *R. sativus*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>Rs3</sub>).

Para a espécie *R. sativus*, o controle visual aos 30 DAA comportou-se de forma semelhante aos 14 DAA (Figura 6). A população HR<sub>Rs1</sub> demonstrou maior nível de resistência quando comparado a população HR<sub>Rs2</sub>, pois foi necessário 38,4 g i. a. ha<sup>-1</sup> para chegar próximo de 50% de controle, enquanto a HR<sub>Rs2</sub>, com essa mesma dose, o controle visual foi próximo de 80%. A alta suscetibilidade da população HR<sub>Rs3</sub> foi demonstrada ao utilizar metade da dose recomendada obtendo-se 90% de controle visual. O controle de *R. sativus*, nas duas populações resistentes, portando mutação Trp-574-Leu, e população suscetível aos herbicidas ALS, Pandolfo et al. (2016) encontraram valores de resposta ao metsulfurom-metil semelhantes a esse trabalho. Ao utilizarem 30 g i. a. ha<sup>-1</sup> do herbicida, a sobrevivência de três populações resistentes foi superior a 20%, enquanto a população suscetível, utilizando 1,2 g i. a. ha<sup>-1</sup>, obtiveram 99% de controle. Também foi evidenciado nesse trabalho variabilidade na resposta a aplicação do herbicida entre as populações resistentes.

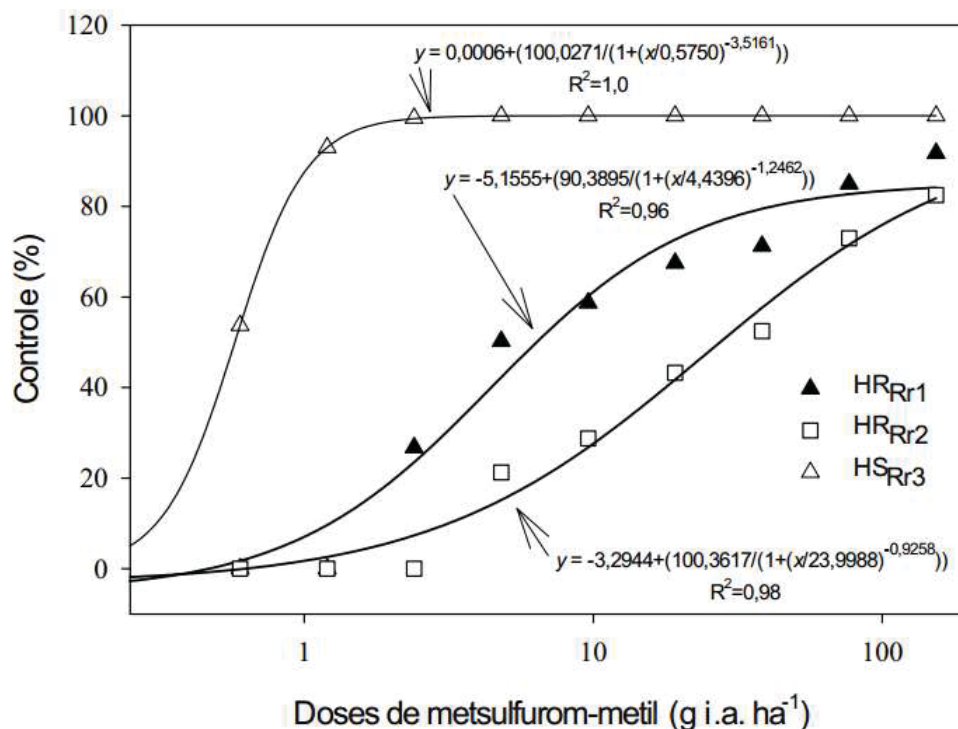


Figura 5 - Controle visual (%) e parâmetros da equação aos 30 dias após aplicação (DAA) de diferentes doses do herbicida metsulfurom-metil em três populações de *R. raphanistrum*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>R1</sub> e HR<sub>R2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>R3</sub>).

Aos 14 DAA do herbicida em *R. raphanistrum*, as populações resistentes demonstraram valores semelhantes para DL<sub>50</sub> e fator F. Já, aos 30 DAA, valores mais altos para esses dois parâmetros foram demonstrados na população HR<sub>R2</sub>, destacando-se maior nível de resistência ao herbicida metsulfurom-metil, enquanto a população HR<sub>R1</sub> demonstrou valor para o Fator F pouco superior a 10 (Tabela 5). Por outro lado, na população HR<sub>R2</sub>, foram estimados valores mais altos para o fator F, atingindo maior grau de resistência. A suscetibilidade da população HS<sub>R3</sub> foi demonstrada ao atingir a DL<sub>50</sub> com apenas 25% da dose recomendada, tanto aos 14 como aos 30 DAA.

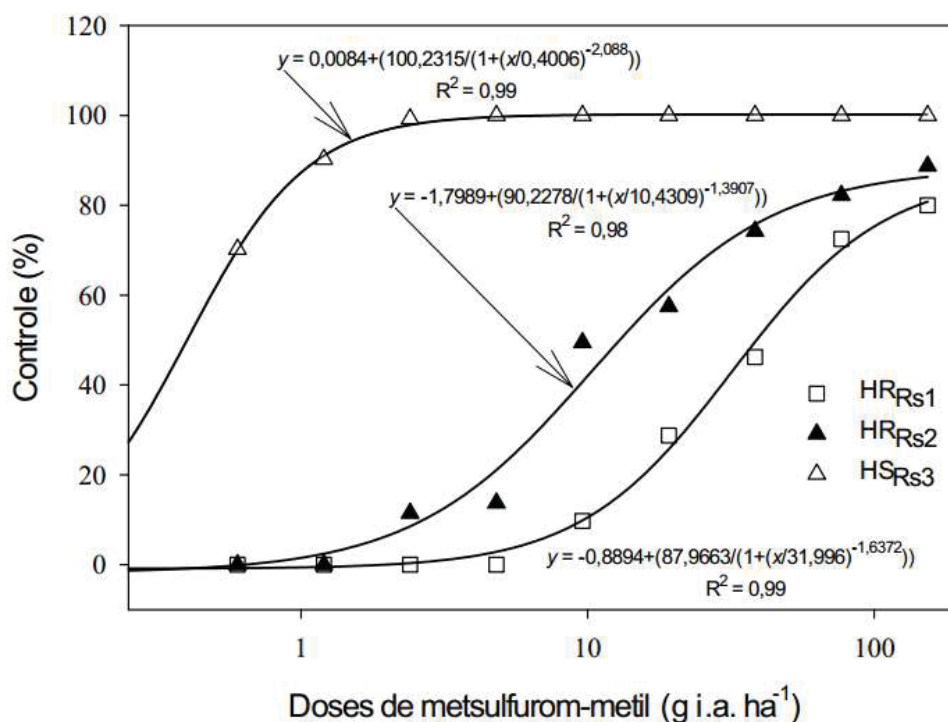


Figura 6 - Controle visual (%) e parâmetros da equação aos 30 dias após aplicação (DAA) de diferentes doses do herbicida metsulfurom-metil em três populações de *R. sativus*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>Rs3</sub>).

Segundo Heap (2005) o critério para definir uma planta daninha com alto grau de resistência a determinado herbicida é quando o fator de resistência (F) for maior ou igual a 10, baseado na GR<sub>50</sub> ou DL<sub>50</sub>. Em *R. sativus*, a população HR<sub>Rs1</sub> destacou-se pelo valor atribuído ao fator F, sendo este superior a 100 aos 14 DAA e, próximo de 100 aos 30 DAA. A população HR<sub>Rs2</sub>, em ambas as datas de avaliação, os valores do fator F ficou em torno de 35. A população HR<sub>Rs3</sub> atingiu a DL<sub>50</sub> com doses do herbicida próximas a 25% da recomendada (Tabela 6).

Tabela 5- Valores obtidos para a DL<sub>50</sub> e fator de resistência (F), de duas populações resistentes (HR<sub>Rf1</sub> e HR<sub>Rf2</sub>) e uma população suscetível (HS<sub>Rf3</sub>) de *R. Raphanistrum*, em relação ao controle visual aos 14 e 30 dias após aplicação (DAA) de metsulfurom-metil

Controle (DAA)	População	DL <sub>50</sub> <sup>1</sup> (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	Fator F
14	HR <sub>Rf1</sub>	16,78	27,57
14	HR <sub>Rf2</sub>	20,49	33,66
14	HS <sub>Rf3</sub>	0,60	-
30	HR <sub>Rf1</sub>	6,36	11,06
30	HR <sub>Rf2</sub>	27,44	47,73
30	HS <sub>Rf3</sub>	0,57	-

<sup>1</sup>Dose necessária para obter controle de 50% em relação as plantas não tratadas de populações resistentes e suscetíveis.

Tabela 6- Valores obtidos para a DL<sub>50</sub> e fator de resistência (F), de duas populações resistentes (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e uma população suscetível (HS<sub>Rs3</sub>) de *R. sativus*, em relação ao controle visual aos 14 e 30 dias após aplicação (DAA) de metsulfurom-metil

Controle (DAA)	População	DL <sub>50</sub> <sup>1</sup> (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	Fator F
14	HR <sub>Rs1</sub>	102,88	153,10
14	HR <sub>Rs2</sub>	23,66	35,2
14	HS <sub>Rs3</sub>	0,67	-
30	HR <sub>Rs1</sub>	38,83	97,14
30	HR <sub>Rs2</sub>	12,93	32,34
30	HS <sub>Rs3</sub>	0,40	-

<sup>1</sup> Dose necessária para obter controle de 50% em relação as plantas não tratadas de populações resistentes e suscetíveis.

A redução de matéria seca da parte aérea (MSPA), aos 30 DAA, variou entre as populações resistentes, nas duas espécies trabalhadas (Figuras 7 e 8). Em *R. raphanistrum* a MSPA reduziu em 47% com a dose recomendada do herbicida, na população HR<sub>Rf1</sub>; enquanto que, na população HR<sub>Rf2</sub> a MSPA reduziu em 25% nessa mesma dose. Na maior dose utilizada a redução da MSPA ficou igual ou próxima a 90% nas duas populações resistentes. Já em *R. sativus*, a redução da MSPA, com a dose recomendada, foi de 10 e

30% nas populações HR<sub>R1</sub> e HR<sub>R2</sub> respectivamente. Quando se utilizou a dose mais alta, a redução foi de 82 a 88%. Para as populações suscetíveis, tanto de *R. raphanistrum* como *R. sativus*, com metade da dose recomendada, já se obteve redução próxima de 100%, ou seja, controle total das plantas. Walsh et al. (2004) obtiveram sobrevivência em mais de 80% em resposta a dose recomendada do herbicida clorsulfuron (SU), ao trabalharem com populações de *R. raphanistrum*, oriundos de lavouras de trigo na Austrália Ocidental e resistentes aos herbicidas inibidores da ALS.

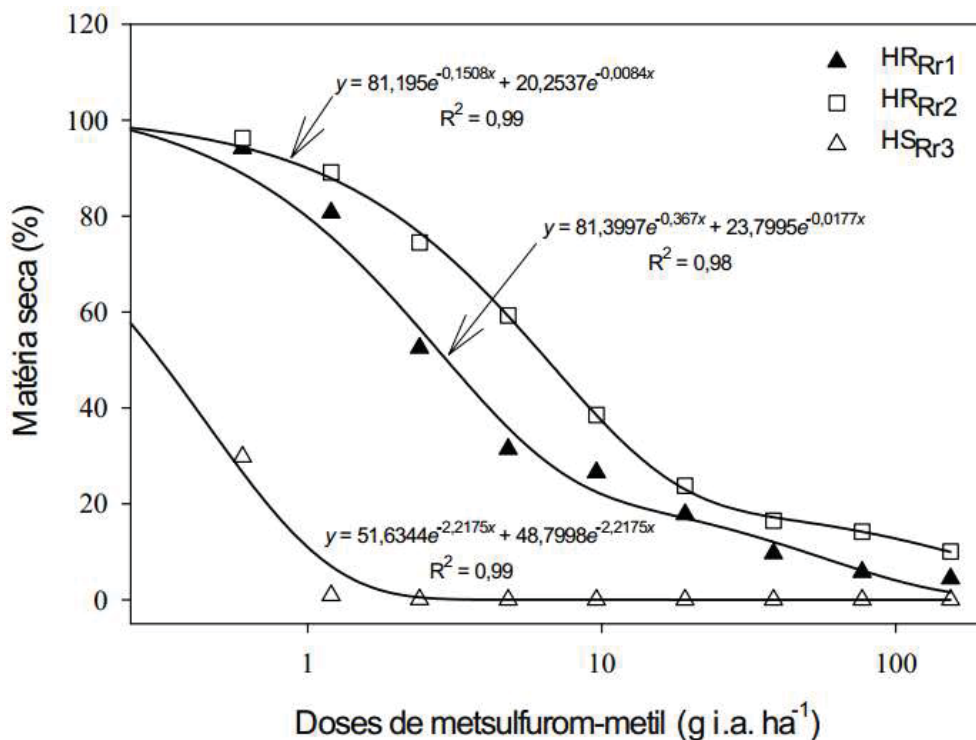


Figura 7 - Porcentagem de matéria seca da parte aérea (MSPA) em relação a testemunha e parâmetros da equação aos 30 dias após aplicação (DAA) de diferentes doses do herbicida metsulfurom-metil em três populações de *R. raphanistrum*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>R1</sub> e HR<sub>R2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>R3</sub>).

Os parâmetros da resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, estimados com a GR<sub>50</sub> em relação a redução de MSPA, assumiram valores mais baixos que os resultados obtidos com a DL<sub>50</sub> em relação ao controle visual aos 30 DAA (Tabela 7). Em *R. raphanistrum* o fator F foi próximo a 10 na população HR<sub>R1</sub>. Para a população HR<sub>R2</sub> o

fator F foi superior em duas vezes a população HR<sub>Rf1</sub>. Em *R. sativus* a população HR<sub>Rs1</sub> apresentou maior nível de resistência comparada as demais, em quanto a população HR<sub>Rs2</sub> o fator F foi igual a 17,9. A suscetibilidade das populações HS<sub>Rf3</sub> e HS<sub>Rs3</sub> foi confirmada pelos baixos valores atribuídos a GR50, sendo de 0,31 e 0,40 g i.a. ha<sup>-1</sup> respectivamente.

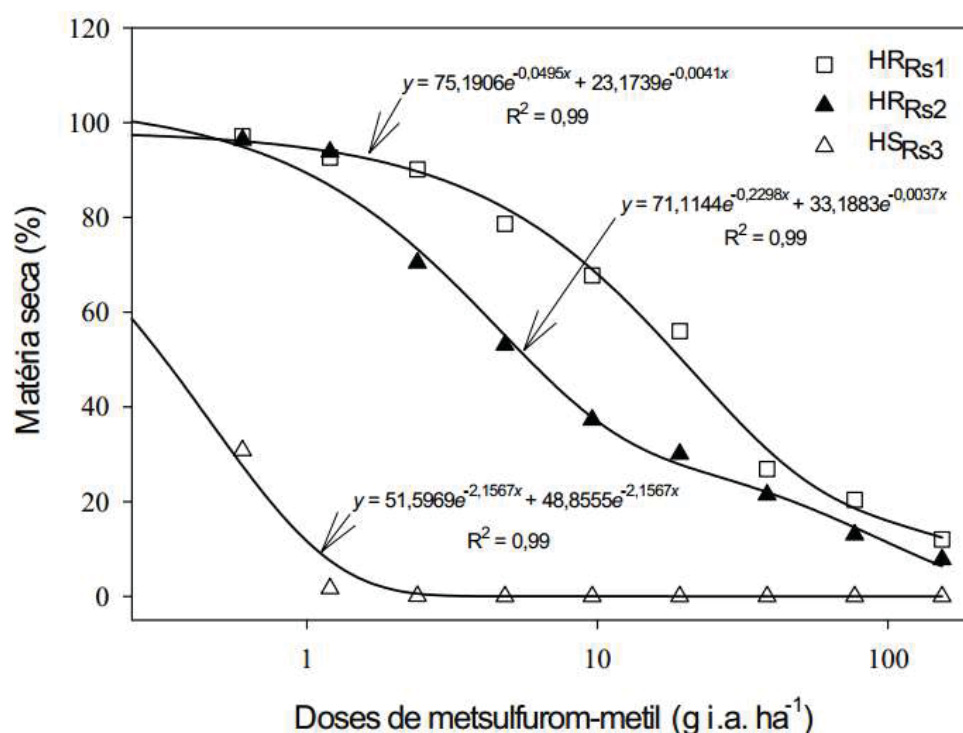


Figura 8 - Porcentagem de matéria seca da parte aérea (MSPA) em relação a testemunha e parâmetros da equação aos 30 dias após aplicação (DAA) de diferentes doses do herbicida metsulfurom-metil em três populações de *R. sativus*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>Rs3</sub>).

Costa e Rizzardi (2014) documentaram a resistência de *R. raphanistrum* aos herbicidas inibidores da ALS, utilizando a população HR<sub>Rf1</sub>, mas sem realizar autopolinização. Em experimentos de dose-resposta ao herbicida metsulfurom-metil, os valores do fator F foram de 267 e 85 para avaliação de controle visual e redução de matéria seca, respectivamente. Pandolfo et al. (2016) também observaram variações no valor do fator F ao trabalharem com populações de *R. sativus* portadoras da mutação Pro-574-Leu. Ao testar 4 populações resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, os valores

do fator F variaram de 25 a 138 em resposta ao herbicida metsulfurom-metil. Já essas mesmas populações submetidas a dose-resposta a imazetapir (IMI), o fator F atingiu valores entre 5000 e 26400, o que caracterizou alta resistência a esse herbicida.

Tabela 7- Valores de dose do herbicida necessária para reduzir em 50% a matéria seca da parte aérea (GR<sub>50</sub>) e fator de resistência (F) de *R. Raphanistrum* e *R. sativus*, obtidos pela redução de matéria seca imposta pelo herbicida metsulfurom-metil, 30 dias após a aplicação (DAA)

Espécie	Populações <sup>1</sup>	GR <sub>50</sub> (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	Fator F
<i>R. raphanistrum</i>	HR <sub>Rr1</sub>	2,96	9,43
	HR <sub>Rr2</sub>	6,52	20,75
	HS <sub>Rr3</sub>	0,31	-
<i>R. sativus</i>	HR <sub>Rs1</sub>	38,83	60,36
	HR <sub>Rs2</sub>	12,93	17,90
	HS <sub>Rs3</sub>	0,40	-

<sup>1</sup> Populações de *R. Raphanistrum* resistente (HR<sub>Rr1</sub> e HR<sub>Rr2</sub>) e suscetível (HS<sub>Rr3</sub>) e, populações de *R. sativus* resistente (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e suscetível (HS<sub>Rs3</sub>) ao herbicida metsulfurom-metil.

Muitas outras espécies de plantas daninhas já foram documentadas, tendo como causa da resistência aos herbicidas inibidores da ALS, a mutação Trp-574-Leu. Em populações de *Lolium rigidum*, portando a mutação homocigota Trp-574-Leu, o fator de resistência aos herbicidas inibidores da ALS (SU, IMI) foi superior a 1000 (YU et al., 2010; KAUNDUN; DALE; BAILLY, 2012). Em *Descurainia sophia*, homocigota para a mutação Trp-574-Leu, o fator de resistência ao herbicida tribenuron metil (SU) foi igual a 366 (DENG et al., 2017).

A mutação Trp-574-Leu também foi identificada por conferir resistência aos herbicidas dos grupos químicos sulfoniluréias, imidazolinonas e pirimidiloxitobenzoatos em *Poa annua* (McELROY et al., 2013). O gene ALS de *Bidens subalternans* foi sequenciado e identificou-se a mutação Trp-574-Leu como precursor da resistência a quatro classes de herbicidas inibidores da ALS (LAMEGO et al., 2009). Populações de *Conyza canadensis* foram altamente resistentes a três classes de herbicidas inibidores da ALS devido a substituição de Trp574 para Leu (MATZRAFI et al., 2015).

Sequenciamento do gene ALS de *Amaranthus palmeri* revelou dois pontos de mutação que conferiu resistência a três grupos químicos de herbicidas inibidores da ALS, Ser 653 para Asn e Trp 574 para Leu, sendo esta última a mais frequente na população (MOLIN et al., 2016).

Triptofano 574 desempenha papéis importantes não só na definição da forma do canal do sítio ativo, mas também na acoplagem dos herbicidas na enzima ALS. Conseqüentemente, mutação no resíduo Trp574 altera o contorno do local de ligação do herbicida, o que resulta na perda de afinidade com muitos herbicidas (DUGGLEBY; McCOURT; GUDDAT, 2008; POWLES; YU, 2010). Portanto, essa mutação é conhecida por resultar em resistência a todos os grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS (TAN; MEED, 2002; BECKIE; TARDIF, 2012).

Dessa forma, essa pesquisa serve como importante informação a ser utilizada no manejo e prevenção de resistência de plantas daninhas a herbicidas ALS. Esses herbicidas são utilizados em larga escala, sendo ainda mais fomentado o uso devido a novas tecnologias em culturas geneticamente modificadas, que carregam genes de resistência a herbicidas. Existem muitas espécies de plantas daninhas do gênero *Raphanus* em lavouras brasileiras. Também é comum o uso de culturas do mesmo gênero ou espécies afins utilizadas como culturas de produção agrícola. Essas espécies são maioria de polinização cruzada, passíveis de ocorrer fluxo gênico entre espécies e populações portadoras de mutações conferindo resistência a herbicidas, exemplo mutação Trp-574-Leu. Isso pode dissimular-se tanto interespecífica como intraespecificamente para diferentes regiões e até países. Em 2016 foi comprovada a resistência de *A. palmeri* a dois mecanismos de ação herbicida, aos inibidores da ALS e EPSPs, no estado do Mato Grosso (HEAP, 2017). Molin et al. (2016) demonstrou a ocorrência natural de fluxo gênico, portando mutação Trp-574-Leu, entre híbridos oriundos de *A. palmeri* e *A. spinosus*. Recentemente foi documentado *R. raphanistrum* portando resistência a glifosato em lavouras da Austrália, sendo relatado pelos autores a suspeita do fluxo gênico oriundo de canola resistente ao glifosato (ASHWORTH, et al., 2014).



Diante dos resultados, pode-se concluir que mutação no gene ALS é uma das principais causas de resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS, não sendo diferente daquelas já citadas na literatura. Em todas as populações ocorreu a mesma mutação, mas houve diferenças entre elas, em relação a dose-resposta ao herbicida metsulfurom-metil, sugerindo que pode haver outros fatores ligados a resistência.

### 3.5 Conclusões

A resistência das populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS é devida a substituição do aminoácido triptofano, na posição 574 do gene ALS, pelo aminoácido leucina. A mutação Ala-360-Ser pode estar associada a resistência aos herbicidas inibidores da ALS.

A mutação triptofano 574 para leucina ocorreu em todas as populações resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, tanto em *R. raphanistrum* como em *R. sativus*.

A mutação triptofano 574 para leucina não foi diferente daquelas já citadas na literatura envolvendo resistência aos herbicidas inibidores da ALS.

A dose-resposta ao herbicida metsulfurom-metil confirmou resistência em *R. raphanistrum* e *R. sativus*, havendo diferença entre populações.

## 4 CAPÍTULO II

Propriedades enzimáticas da acetolactato sintase (ALS) e mecanismos de resistência não relacionados ao local de ação (NRLA) em *Raphanus raphanistrum* e *R. sativus*.

### 4.1 Resumo

*Raphanus raphanistrum* L. e *R. sativus* L. são espécies que possuem capacidade reprodutiva e adaptação em vários habitats. Os casos de resistência em espécies do gênero *Raphanus*, estão relacionados, principalmente, aos herbicidas inibidores da ALS. Esses herbicidas exercem alta pressão de seleção devido a utilização em larga escala em culturas de inverno. O objetivo desse trabalho foi caracterizar os parâmetros enzimáticos da enzima ALS, obter a dose resposta *in vitro* da enzima ALS ao herbicida imazapic e avaliar se há envolvimento do complexo citocromo P450 monooxigenase na resistência em populações *R. raphanistrum* e *R. sativus*, portadores da mutação Trp-574-Leu, oriundos de diferentes regiões agrícolas de trigo no sul do Brasil. A extração da enzima ALS e o bioensaio *in vitro* seguiu a metodologia descrita por Singh, Stidham e Shaner (1988) e Yu et al. (2010). Para isso foi conduzido experimentos em casa de vegetação e laboratório pertencentes ao Agriculture and AgriFood Canada, Ottawa Research and Development Centre, em Ottawa- Ontário- CA. Avaliou-se a atividade da enzima ALS na presença do herbicida imazapic; a concentração de substrato (piruvato) que fornece velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação ( $K_M$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ). Já o ensaio de metabolização pelo complexo citocromo P450 monooxigenase, realizou-se em laboratório e casa de vegetação na Universidade de Passo Fundo, em Passo Fundo, RS, Brasil. Os tratamentos utilizados foi aplicação de inibidores da citocromo P450 monooxigenase (malation) associado ao herbicida metsulfurom-metil, o herbicida isolado e tratamento sem nenhuma aplicação. Os parâmetros avaliados foram controle e redução de matéria seca da parte aérea (MSPA). As populações resistentes demonstraram insensibilidade ao herbicida imazapic. Os parâmetros cinéticos da enzima ALS se alteraram com o aumento no  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  nas populações resistentes comparadas as populações suscetíveis nas duas espécies. Não há envolvimento do complexo citocromo P450 monooxigenase na resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS.

Palavras-chave: 1. Citocromo P450 monooxigenase. 2. Ensaio enzimático. 3. Parâmetros cinéticos.

## 4.2 Introdução

As espécies de *Raphanus raphanistrum* L. e *R. sativus* L. estão presentes em várias culturas agrícolas devido possuir alta capacidade reprodutiva e adaptação em vários habitats. Essas duas espécies são descritas como plantas daninhas anuais de inverno, mas que podem germinar no verão, sendo também consideradas espécies facultativas (KISSMANN; GROTH, 1999, p. 535; WARWICK; FRANCIS, 2005; MADHOU et al., 2005). Nos últimos anos, foram relatados inúmeros casos de resistência a herbicidas em espécies do gênero *Raphanus*. Resistência cruzada aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) foi identificado em *R. raphanistrum* em lavouras da Austrália, África do Sul e Brasil e, com resistência múltipla à outros mecanismos de ação herbicida na Austrália Ocidental (HASHEM et al., 2001b; SMIT; CAIRNS, 2001; WALSH et al., 2004; ASHWORTH et al., 2014; COSTA; RIZZARDI, 2014). Em *R. sativus* resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS foi relatada na Argentina, Chile e Brasil (THEISEN, 2008; PANDOLFO et al., 2013; HEAP, 2017).

O aceto-hidroxiácido sintase (AHAS) (AHAS, EC 2.2.1.6), também conhecida como ALS, é a primeira enzima na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, valina e leucina. A inibição da ALS leva à inanição destes aminoácidos e causa a morte da planta. Cinco famílias químicas de herbicidas comercialmente disponíveis partilham a enzima ALS como sítio alvo de ação: sulfonilureias (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), pirimidinilbenzoatos (PB) e sulfonilaminocarboniltriazolinonas (SACT). Os herbicidas inibidores da ALS são amplamente utilizados devido ao baixo impacto ambiental, baixa toxicidade em mamíferos, ampla seletividade das culturas e alta eficácia de controle com baixa taxa de dose (SHANER, 1999; TRANEL; WRIGHT, 2002; DUGGLEBY; McCOURT; GUDDAT, 2008).

A resistência genética a esses herbicidas é, geralmente, devido à redução na sensibilidade da enzima alvo conferido por uma ou mais mutações dentro do gene ALS (TAN; MEDD, 2002; YU; POWLES, 2014). O mecanismo de resistência frequentemente relatado em plantas resistentes aos herbicidas inibidores de ALS, baseia-se em uma única

substituição de aminoácidos na enzima ALS. Existem cinco regiões altamente conservados no gene ALS. Em todos os casos investigados, a resistência aos herbicidas inibidores da ALS foi atribuída a uma alteração em um dos oito aminoácidos localizados nestas regiões incluindo Ala-122, Pro-197, Ala-205, Asp-376, Arg-377, Trp-574, Ser-653 e Gly-654. Essas substituições desses aminoácidos no sítio de ação do gene ALS, que ocorrem naturalmente em populações de plantas daninhas, são selecionadas com a aplicação do herbicida. As mutações nestes oito aminoácidos interrompem a ligação do herbicida convertendo assim a enzima antes suscetível em enzima resistente ao herbicida (TAN; MEDD, 2002; CORBETT; TARDIF, 2006; HEAP, 2017). Diferentes mutações resultam em vários padrões de resistência cruzada. Por exemplo, a substituição de Trp-574-Leu confere resistência a todas as famílias de herbicidas inibidores de ALS em muitas espécies de plantas daninhas, enquanto que a substituição de Ala-122-Thr confere resistência aos herbicidas IMI mas não aos herbicidas SU (BECKIE; WARWICK; SAUDER, 2012a; POWLES; YU, 2010).

Poucos casos de resistência em plantas daninhas foram relatados possuindo acúmulo de mecanismos de resistência aos herbicidas inibidores de ALS, ou seja, envolvendo resistência devido ao sítio de ação alterado e resistência não envolvendo alterações no sítio de ação do herbicida. Mecanismo de resistência a herbicidas não dotados de mutações no sítio de ação, geralmente, envolvem desintoxicação dos herbicidas pela glutathione S-transferase (GST) (TAL; HALL; STEPHENON, 1995) ou citocromo P450 monooxygenase (CHRISTOPHER; POWLES; HOLTUM, 1992; HAN et al., 2013), absorção reduzida (KOGER; REDDY, 2005) ou redução da translocação na planta (FENG et al., 2004) e sequestro nos vacúolos (GE et al., 2010). Outras famílias de proteínas também podem estar envolvidas, como: proteínas transportadoras, glicosiltransferases, esterases, hidrolases, oxidases e peroxidases. Esse tipo de resistência também pode ser conferido por regulação gênica que codificam essas proteínas ou mudanças de aminoácidos que conferem maior capacidade de degradação do herbicida (YUAN; TRANEL; STEWART Jr., 2007; DÉLYE; JASIENIUK; Le CORRE, 2013; YU; POWLES, 2014).

Em muitos casos de resistência, envolvendo mutação no sítio de ação do herbicida, a funcionalidade da enzima pode ser alterada (VILA-AIUB; NEVE; POWLES, 2009a). Esses possíveis efeitos decorrentes de mutação na enzima ALS poderão ser alterações nas características cinéticas da enzima, como na concentração de substrato (piruvato), que fornece velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação ( $K_M$ ), velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima ( $I_{50}$ ) (VILA-AIUB; GUNDEL; PRESTO, 2015). Resistência à herbicidas nas espécies *Lolium rigidum*, *Raphanus raphanistrum* e *Kochia scoparia*, devido a mutações no gene ALS, resultou em alteração na atividade enzimática ou nos parâmetros cinéticos da enzima ALS (YU et al., 2003; YU et al., 2010; LÉGÈRE et al., 2013; LI et al., 2013).

Após ser identificada a mutação Trp-574-Leu na enzima ALS em *R. raphanistrum* e *R. sativus* resistentes aos herbicidas inibidores da ALS e, haver diferenças na resposta à dose de metsulfurom-metil entre populações, a hipótese gerada é que essas diferenças podem estar associadas a outros mecanismos de resistência, inclusive às propriedades da atividade enzimática da ALS. Com isso, o objetivo dessa pesquisa foi caracterizar os parâmetros enzimáticos da enzima ALS, obter a dose resposta *in vitro* da enzima ALS ao herbicida imazapic e avaliar a resposta à aplicação de metsulfurom-metil após tratamento com inibidores do metabolismo da citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase nas populações em estudo.

### **4.3 Material e Métodos**

#### **4.3.1 Material vegetal**

O material vegetal foi coletado e conduzido conforme descrito no Capítulo I, assim como a purificação das populações para a homozigose da resistência através de autopolinização. Plantas oriundas de sementes autopolinizadas foram conduzidas em vasos plásticos contendo mistura de solo e fibra de coco, em casa de vegetação, e ao atingirem três a quatro folhas verdadeiras, selecionou-se dez plantas de cada população para a retirada do tecido foliar e, conseqüentemente, fazer a extração da enzima para realizar o ensaio dose

resposta ao herbicida imazapic e o ensaio atividade da enzima ALS. Esse experimento foi conduzido no período de outubro de 2015 a janeiro de 2016, em casa de vegetação e laboratório pertencente ao AAFC (Agriculture and AgriFood Canada), (ORDC) Ottawa Research and Development Centre, em Ottawa- Ontário- CA.

Para a realização do experimento metabolização do citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase, as plantas foram conduzidas em vasos plásticos dentro de casa de vegetação com umidade controlada na Universidade de Passo Fundo, em Passo Fundo, RS, Brasil, no período de fevereiro a abril de 2015.

#### **4.3.2 Extração da enzima ALS**

O método de extração enzimática seguiu a metodologia descrita por Singh, Stidham e Shaner (1988), Yu et al. (2010) com algumas modificações, onde cada amostra de material vegetal foi composta de folhas novas completamente expandidas, de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, desprovidas das nervuras. Coletou-se 7 g de material vegetal (folhas) que foram congelados em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) e macerados em almofariz até formar pó fino. Após, adicionou-se ao material macerado, 70 mL (1:10 p/v) do tampão de extração fosfato 100 mM, pH 7,5, a 4°C, contendo: 0,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 10 mM de piruvato de sódio; 0,5 mM de tiamina pirofosfato (TPP); 10 µM de flavina adenina dinucleotídeo (FAD); 10% v/v de glicerol; 1mM de ditiotreitól e 5% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Posteriormente, o material foi homogeneizado lentamente e mantido sob agitação por 20 minutos a 4 °C, sendo posteriormente a mistura filtrada com gaze em quatro camadas para remoção e descarte dos resíduos sólidos. A fração líquida foi posta para centrifugar a 4500 rpm por 80 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e o resíduo foi descartado.

#### **4.3.3 Bioensaio “*in vitro*” com a enzima ALS**

O experimento foi realizado em delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições. O bioensaio *in vitro* foi realizado seguindo a

metodologia proposta por Yu et al. (2010) com algumas modificações. O bioensaio foi realizado em tubos de ensaio, sendo os tratamentos arranjados em esquema fatorial, tendo como fator A, a solução enzimática das diferentes populações dentro de cada espécie (Tabela 1) onde cada tubo recebeu 300 µL da enzima e, o fator B foi composto de diferentes concentrações do herbicida imazapic (herbicida do grupo químico imidazolinonas) (0; 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 10; 50; 100; 500 e 1000 µM) sendo adicionados 50 µL da solução herbicida por tubo de ensaio. Cada tubo recebeu ainda 150 µL do tampão de reação fosfato 80 µM, pH=7,0, contendo 20 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 200 mM de piruvato, 2 mM de tiamina pirofosfato (TPP) e 20 µM de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) totalizando 500 µL (volume final da reação). Ainda, adicionou-se dois tratamentos, sem a presença do herbicida, utilizando apenas 300 µL da enzima e 150 µL do tampão de reação ao bioensaio, sendo que em um deles, denominado zero, adicionou-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 3M para que não houvesse atividade enzimática. No outro tratamento adicionou-se, além da enzima e do tampão de reação, 50 µL de água Milli-Q sendo este denominado padrão ou 100% de atividade enzimática, correspondendo à testemunha sem inibidor. Os valores de absorvância desse tratamento foram descontados dos valores das leituras dos demais tratamentos com herbicida e do tratamento com ácido sulfúrico.

Após o preparo da reação nos tubos de ensaio, foi iniciado o primeiro período de incubação, por 60 minutos a 30 °C, sendo esta reação interrompida com adição de 50 µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M, exceto no controle zero em que a reação já havia sido interrompida inicialmente. Para a formação de acetoína, a partir da reação do ácido sulfúrico com o acetolactato, formado durante a primeira reação, realizou-se a segunda incubação por 15 minutos a 60 °C. Para a formação do complexo colorido foram adicionados 500 µL da solução de creatina 0,5% p/v e 500 µL de 1-naphtol 5% p/v, preparado em hidróxido de sódio (NaOH 2,5M) no momento do uso. Após isso, a reação foi novamente incubada por 15 minutos a 60 °C, para o desenvolvimento da cor, que variou em tons de rosa claro a vermelho claro, contrastando com a cor marrom esverdeada do padrão zero. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorvância lida em espectrofotômetro a 530 nm.

Os valores referentes à atividade da enzima ALS foram apresentados por quantidade de acetoína produzida ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ), determinado pela curva padrão. A determinação da curva padrão de acetoína realizou-se em tubos de ensaio com três repetições. Cada tubo conteve 300  $\mu\text{L}$  de solução de acetoína nas concentrações de 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 200  $\mu\text{M}$  mais 150  $\mu\text{L}$  do tampão de reação fosfato 80  $\mu\text{M}$ , pH=7,0. Para a formação do complexo colorido foi adicionado em cada tubo 500  $\mu\text{L}$  de solução de creatina e 500  $\mu\text{L}$  de 1-naphtol, preparados conforme explicado anteriormente. Após o preparo da reação, a mistura foi incubada por 15 minutos a 60 °C, para o desenvolvimento da cor. Os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a absorbância lida em espectrofotômetro a 530 nm.

Os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  informam a afinidade da enzima com o substrato. Para a obtenção do  $K_M$  e do  $V_{m\acute{a}x}$ , realizou-se o ensaio utilizando dez concentrações do substrato (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 100 mM) em todas as populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus*. As concentrações do substrato foram obtidas através da combinação entre o tampão de reação fosfato 80  $\mu\text{M}$ , pH 7,0, com a solução padrão de piruvato a 100 mM. Ao tampão de reação fosfato 80  $\mu\text{M}$ , pH 7,0 adicionou-se 20 mM de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), 2 mM de tiamina pirofosfato (TPP) e 20  $\mu\text{M}$  de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e, à solução padrão de piruvato a 100 mM adicionou-se 100 mL do tampão de reação com 100 mM de piruvato.

Os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram determinados através da equação de Michaelis Menten (Equação 3), utilizando o software SigmaPlot 12.5.

$$y = \frac{V_{m\acute{a}x} * X}{K_M + X}$$

Equação 3-  $y$  = atividade da enzima ALS ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ );  $V_{m\acute{a}x}$  = velocidade máxima de reação;  $X$  = concentração do substrato (piruvato) e,  $K_M$  = concentração de substrato (piruvato) que fornece velocidade inicial igual à metade da velocidade máxima de reação.

Os valores de absorbância foram corrigidos, subtraindo-se dos demais, o valor do controle zero. Calculou-se o  $I_{50}$ , que representa a quantidade do inibidor necessária para inibir 50% da atividade da enzima, através do modelo de regressão não linear sigmoidal



logístico de três parâmetros (Equação 4) (SEEFELDT; JENSEN; FUERST, 1995), utilizando o software SigmaPlot 12.5.

$$y = \frac{a}{\left(1 + \left(\frac{x}{xI_{50}}\right)^b\right)}$$

Equação 4-  $y$  = atividade da enzima ALS (%);  $a$  = assíntota de máxima;  $x$  = dose do herbicida imazapic ( $\mu\text{M}$ );  $xI_{50}$  = dose do herbicida imazapic ( $\mu\text{M}$ ) correspondente a 50% da inibição da enzima ALS e  $b$  = declividade da curva.

O fator de resistência (FR), calculou-se através da divisão do  $I_{50}$  do biótipo resistente pelo valor correspondente do biótipo suscetível, que expressa o número de vezes a dose necessária para inibir 50% da atividade da enzima do biótipo resistente comparado ao mesmo efeito no biótipo suscetível (HALL; STROMME; HORSMAN, 1998; BURGOS, 2015). Em cada população foi mensurado os teores de proteínas totais seguindo a metodologia de Bradford (1976). Após o preparo das amostras, realizou-se a leitura em espectrômetro a 595nm onde o teor de proteína de cada população foi interpolado com a curva padrão de proteína.

#### 4.3.4 Metabolização do citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase

Quando a maioria das plantas atingiram o estágio de desenvolvimento de três a quatro folhas verdadeiras, os vasos foram retirados da casa de vegetação para aplicação do herbicida metsulfurom-metil. A aplicação foi realizada com pulverizador costal de precisão, pontas jato plano XR 11002, na altura de 50 cm acima do alvo com volume de aplicação de 200 L ha<sup>-1</sup>. Após a aplicação do herbicida, os vasos foram levados para a casa de vegetação, permanecendo sem irrigação por 24 horas a fim de não interferir na absorção do herbicida.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial, onde o fator A compreendeu as populações, separados por espécie, onde cada espécie compõe experimento diferente (*R. raphanistrum*- HR<sub>Rf1</sub>, HR<sub>Rf2</sub> e HS<sub>Rf3</sub>; *R. sativus*- HR<sub>Rs1</sub>, HR<sub>Rs2</sub> e HS<sub>Rs3</sub>, seguindo a nomenclatura da Tabela 1) e, o fator B avaliou os inibidores da citocromo P450

monooxigenase (malathion) mais o herbicida metsulfurom-metil. Os tratamentos constituíram-se pela aplicação de malathion mais aplicação do herbicida isolado, apenas o herbicida e testemunha sem aplicação. Trinta minutos antes da aplicação do herbicida metsulfurom-metil, na dose de 3,5 g i.a. ha<sup>-1</sup>, aplicou-se o inibidor de metabolização malathion na dose de 500 g i.a. ha<sup>-1</sup> seguindo metodologia proposta por Yu et al. (2009).

Avaliou-se o controle aos 30 dias após aplicação (DAA). Utilizou-se como base a escala percentual, em que a nota 0% correspondeu a nenhum efeito do herbicida e a nota 100% significou morte completa das plantas. A matéria seca da parte aérea (MSPA) também foi avaliada, cortando-se rente ao solo, todas as plantas do vaso aos 30 DAA e, posteriormente, secadas em estufa a 65 °C por 72 horas até peso constante, quando foi realizada a quantificação da MSPA em balança de precisão. Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk), transformados ( $y = \sqrt{x + 1}$ ) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Quando significativos, realizou-se o teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

#### **4.4 Resultados e Discussão**

##### **4.4.1 Bioensaio “*in vitro*” da enzima ALS com o herbicida imazapic**

Os parâmetros enzimáticos da enzima ALS nas populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, resistentes e suscetíveis ao herbicida metsulfurom-metil foram obtidos através da produção de acetoína e do teor de proteína analisada em cada população. A partir desses resultados, construiu-se as curvas padrão para proteína e acetoína (Figuras 9 e 10).

Notou-se que a enzima ALS extraída da população suscetível, tanto de *R. raphanistrum* como de *R. sativus*, teve sua atividade altamente inibida pelo herbicida imazapic (Figuras 11 e 12). Já entre as populações resistentes diferiram em relação a resposta à inibição da atividade enzimática da ALS (Figura 11 e 12). As populações de *R. raphanistrum* HR<sub>R1</sub> e HR<sub>R2</sub> demonstraram ser resistentes ao herbicida imazapic, destacando-se a população HR<sub>R1</sub> por ter baixa resposta a inibição enzimática ao herbicida. Da mesma forma, nas populações de *R. sativus*, a HR<sub>S1</sub> demonstrou maior

insensibilidade ao herbicida em relação a HR<sub>Rs2</sub>. Resultados semelhantes foram demonstrados por ambas as espécies em resposta as doses crescentes do herbicida metsulfurom-metil no Capítulo I.

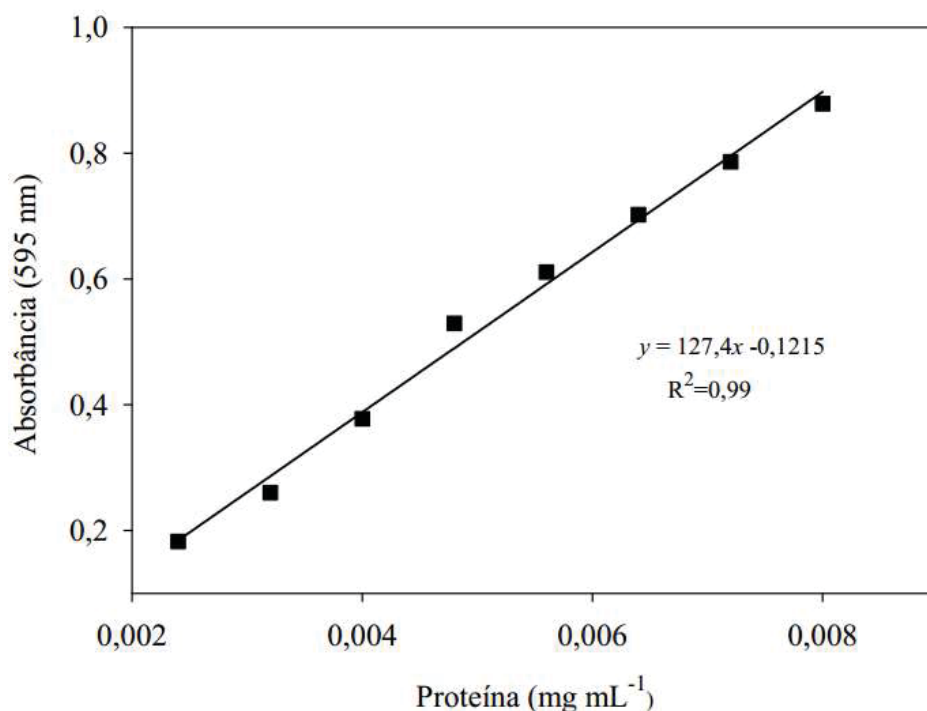


Figura 9 - Curva padrão de proteína utilizada para a determinação da atividade da enzima ALS.

Os valores de  $I_{50}$  e fator F são observados na Tabela 8. A quantidade do herbicida imazapic necessária para atingir a inibição de 50% da atividade da enzima ALS ( $I_{50}$ ) nas populações suscetíveis de *R. raphanistrum* e *R. sativus* foram de 1,74 e 1,38  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Já para a populações HR<sub>Rf1</sub> foi necessário 465 vezes o valor da  $I_{50}$  da população suscetível e, na população HR<sub>Rs1</sub> foi necessário 672 vezes a  $I_{50}$  da população suscetível, demonstrando alta resistência (fator F) para essas duas populações. Na população HR<sub>Rf2</sub> o fator F foi igual a 17, sendo inferior em relação a população HR<sub>Rf1</sub>.

Resistência intermediária notou-se na população HR<sub>R52</sub> ao necessitar de 176 vezes a dose de imazapic para atingir 50% de controle comparado com a testemunha suscetível.

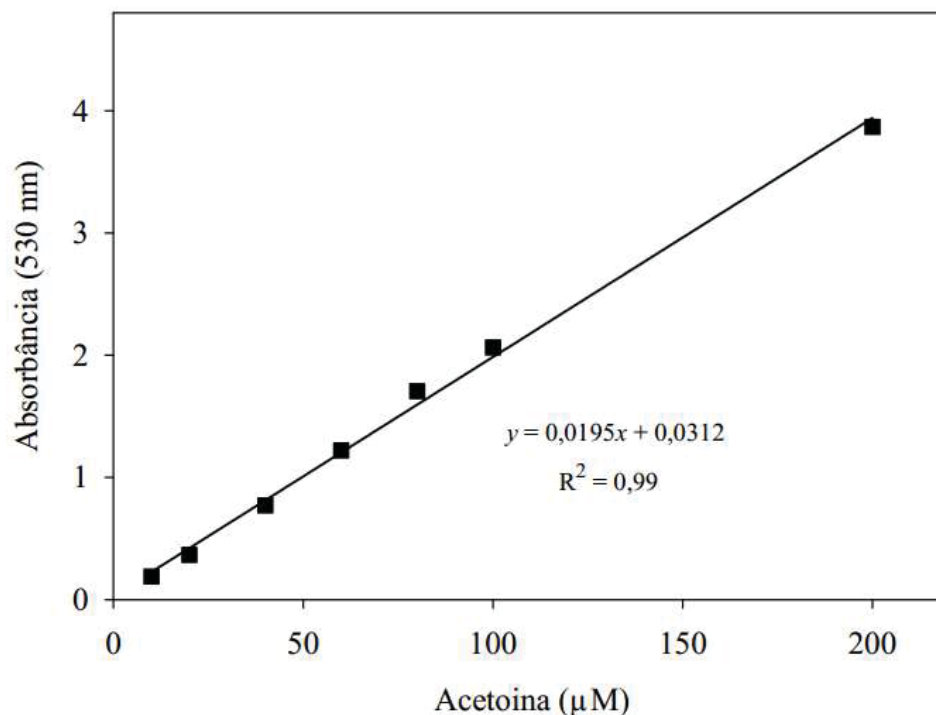


Figura 10 - Curva padrão de acetoina produzida para a determinação da atividade da enzima ALS.

Cechin et al. (2017) ao trabalharem com dois biótipos de *Raphanus sativus*, resistentes aos herbicidas inibidores da ALS e portadores da mutação Trp-574-Leu, apresentaram valores altos para o fator F em resposta ao herbicida do grupo químico IMI. A dose-resposta ao herbicida imazethapyr, através de ensaio enzimático, atingiu valores entre 133 e 224 para o fator F. Já para o herbicida iodosulfuron o fator F ficou entre 15 e 19. Pandolfo et al. (2016) também observaram valores altos para o fator de resistência ( $F > 5000$ ) em *R. sativus* com polimorfismo Trp-574-Leu no gene ALS, para herbicida IMI.

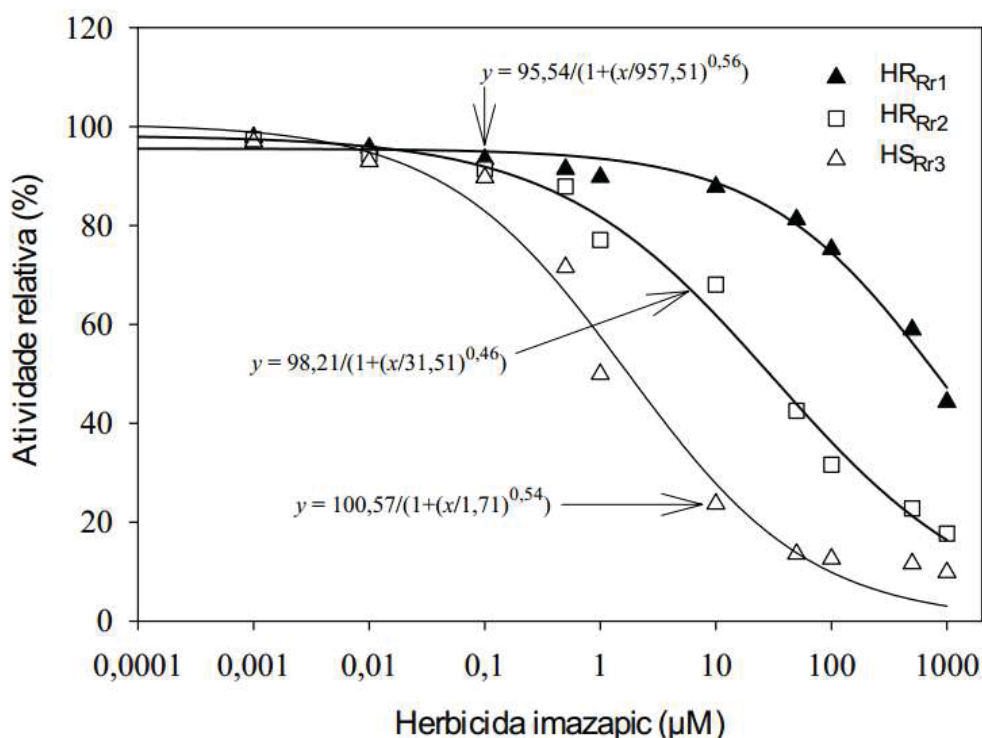


Figura 11 - Atividade relativa da enzima ALS em função de doses crescentes do herbicida imazapic em três populações de *R. raphanistrum*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>R1</sub> e HR<sub>R2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>R3</sub>) ao herbicida metsulfurom-metil.

Através dos resultados obtidos no Capítulo I e nesse capítulo, pode-se afirmar que as populações de *R. raphanistrum* HR<sub>R1</sub> e HR<sub>R2</sub>, *R. sativus* HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>, possuem resistência cruzada aos herbicidas dos grupos químicos imidazolinonas e sulfoniluréias. Na maioria das espécies resistentes, portadoras da mutação Trp-574-Leu, é comum a resistência cruzada a essas duas classes químicas (SU e IMI) dos herbicidas inibidores da ALS (BECKIE; WARWICK; SAUDER, 2012a; POWLES; YU, 2010; YU; POWLES, 2014). Yu et al. (2012) relataram em populações de *R. raphanistrum*, purificadas para a mutação Trp-574-Leu, resistência às três principais classes herbicidas inibidores da ALS, ou seja, resistência cruzada a IMI, SU e TP. *Poa annua*, com mutação no gene ALS Trp-574-Leu, foi resistente aos herbicidas dos grupos químicos pirimidil-benzoatos, sulfoniluréias e imidazolinonas (McELROY et al., 2013).

Conforme Yu; Powles (2014) polimorfismo na posição Trp-574, assim como Ala-122 e Pro-197, são mutações mais fortes e normalmente tem como principal característica ocasionar maior grau de resistência aos herbicidas inibidores da ALS quando comparadas com demais mutações já identificadas no gene ALS. Isso ficou evidenciado nesse trabalho onde a maioria das populações resistentes de *R. sativus* e *R. raphanistrum* portadoras da mutação Trp-574-Leu atingiram valores altos para o fator F, exceto na população HR<sub>R2</sub>.

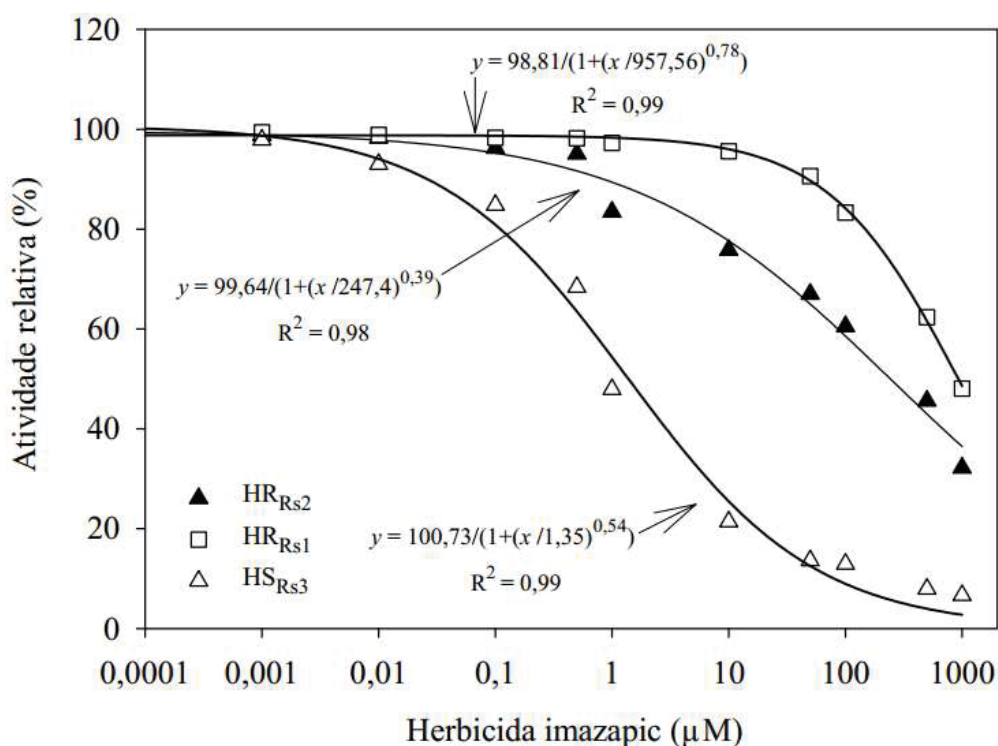


Figura 12 - Atividade relativa da enzima ALS em função de doses crescentes do herbicida imazapic em três populações de *R. sativus*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>R1</sub> e HR<sub>R2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>R3</sub>) ao herbicida metsulfurom-metil.

Tabela 8- Dose do herbicida imazapic ( $\mu\text{M}$ ) necessária para inibir 50% da atividade da enzima ALS ( $I_{50}$ ) e fator de resistência (F) de *R. Raphanistrum* e *R. sativus*

Espécie	Populações <sup>1</sup>	$I_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Fator F
<i>R. raphanistrum</i>	HR <sub>Rr1</sub>	810	465
	HR <sub>Rr2</sub>	29,1	17
	HS <sub>Rr3</sub>	1,74	-
<i>R. sativus</i>	HR <sub>Rs1</sub>	928	672
	HR <sub>Rs2</sub>	242,8	176
	HS <sub>Rs3</sub>	1,38	-

<sup>1</sup> Populações de *R. Raphanistrum* resistente (HR<sub>Rr1</sub> e HR<sub>Rr2</sub>) e suscetível (HS<sub>Rr3</sub>) e, populações de *R. sativus* resistente (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e suscetível (HS<sub>Rs3</sub>) aos herbicidas inibidores da ALS.

#### 4.4.2 Bioensaio “*in vitro*” da atividade enzimática da ALS

Os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da enzima ALS, nas populações resistentes de *R. raphanistrum*, foram superiores à população suscetível (Figura 13). Nas populações HR<sub>Rr1</sub> e HR<sub>Rr2</sub> o  $V_{m\acute{a}x}$  foi 6,1 e 3,3; o  $K_M$  1,7 e 1,6 vezes superiores em relação a população suscetível, respectivamente. Para as populações de *R. sativus* os resultados foram semelhantes, com pequeno acréscimo em relação ao parâmetro enzimático  $K_M$  nas populações resistentes (Figura 14). O  $V_{m\acute{a}x}$  atingiu valor igual a 5,4 e 3,5;  $K_M$  igual a 1,9 e 2,0 vezes superior à população suscetível em HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>, respectivamente. Os valores de  $K_M$  das populações suscetíveis nas duas espécies foram de 0,8 e 1,0 mM, valores esses similares, estando de acordo com relatos em outros trabalhos (PRESTON et al., 2006; LI et al., 2013). Esses resultados mostram que há alterações na atividade enzimática, o que pode estar associada a resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS. A baixa afinidade da enzima ( $> K_M$ ) pelo substrato (piruvato) pode ser compensada pela alta eficiência na conversão de piruvato, caracterizado pelo maior  $V_{m\acute{a}x}$ . Conforme Dewaele et al. (1997) o acoplamento do substrato pode ser realizado no mesmo local ou em diferentes locais da enzima, já que mutações a nível enzimático afeta a conformação do sítio de ação.

Resultados semelhantes observou-se em estudo com oito populações de *R. raphanistrum*, resistentes aos herbicidas ALS devido ao polimorfismo Pro-197- His, Thr, Ser ou Ala. Observou-se maior atividade da enzima ALS, cerca de três a cinco vezes mais em relação as populações suscetíveis. Os autores concluíram que a alta atividade da enzima ALS poderia contribuir para o elevado grau de resistência aos herbicidas SU (YU et al., 2003). Em populações de *Lolium rigidum*, homozigotas para a mutação Trp-574-Leu, não houve alteração no  $K_M$ , mas aumento do  $V_{m\acute{a}x}$  em 2,9 vezes em relação ao biótipo suscetível (YU et al., 2010). Da mesma forma, dois biótipos de *R. sativus*, portando a mesma mutação, não houve mudança significativa no  $K_M$ , mas acréscimo no  $V_{m\acute{a}x}$  comparados ao biótipo suscetível (CECHIN et al., 2017).

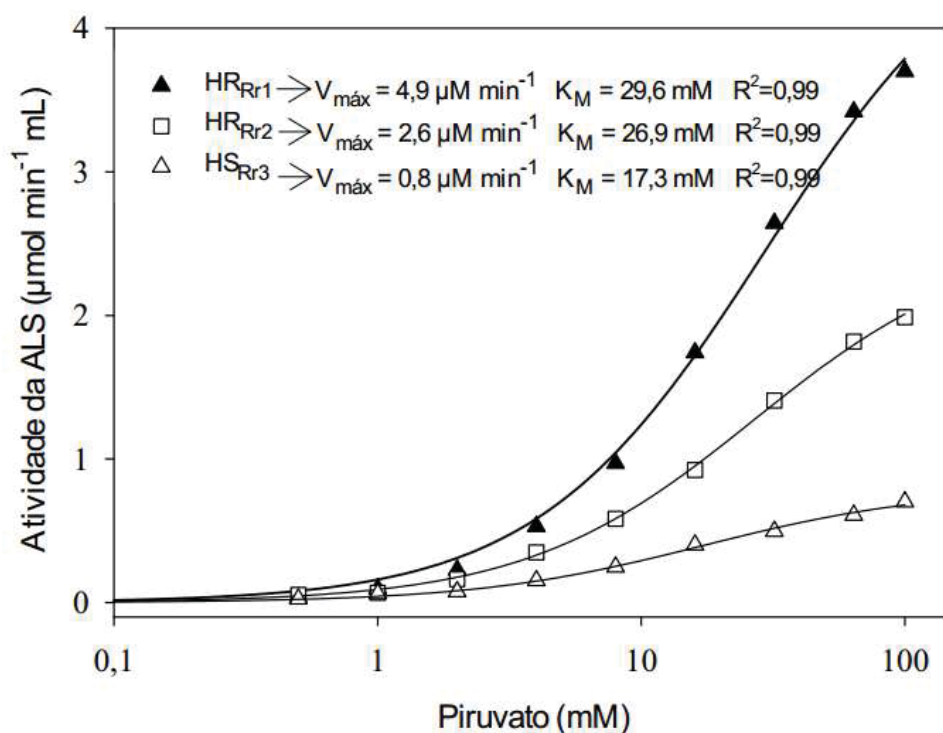


Figura 13 - Atividade da enzima ALS em função de diferentes concentrações de piruvato em três populações de *R. raphanistrum*, sendo duas populações resistentes ( $HR_{Rr1}$  e  $HR_{Rr2}$ ) e uma suscetível ( $HS_{Rr3}$ ) ao herbicida metsulfurom-metil.  $K_M$  = Concentração de piruvato que fornece a velocidade inicial igual a metade da velocidade máxima de reação;  $V_{m\acute{a}x}$  = Velocidade máxima de reação.



Já, resultados contrastantes foram observados em populações de *R. raphanistrum* homocigotas para a resistência no alelo Trp-574, onde a atividade da enzima ALS foi inferior em 50% ao da atividade enzimática de populações suscetíveis. Já para populações homocigotas para resistência no alelo Tyr-122, Ser-197 ou Glu-376, a atividade enzimática foi superior em 1,5 a 1,9 vezes em relação a população suscetível (LI et al., 2013). Em biótipos de *Euphorbia heterophylla*, com resistência múltipla a herbicidas inibidores da ALS e inibidores de protox, observou-se maior afinidade da enzima pelo substrato comparados aos biótipos suscetíveis, caracterizado pelo baixo  $K_M$  no biótipo suscetível comparado aos biótipos resistentes. Não houve diferenças acentuadas na velocidade máxima de reação (XAVIER et al., 2013).

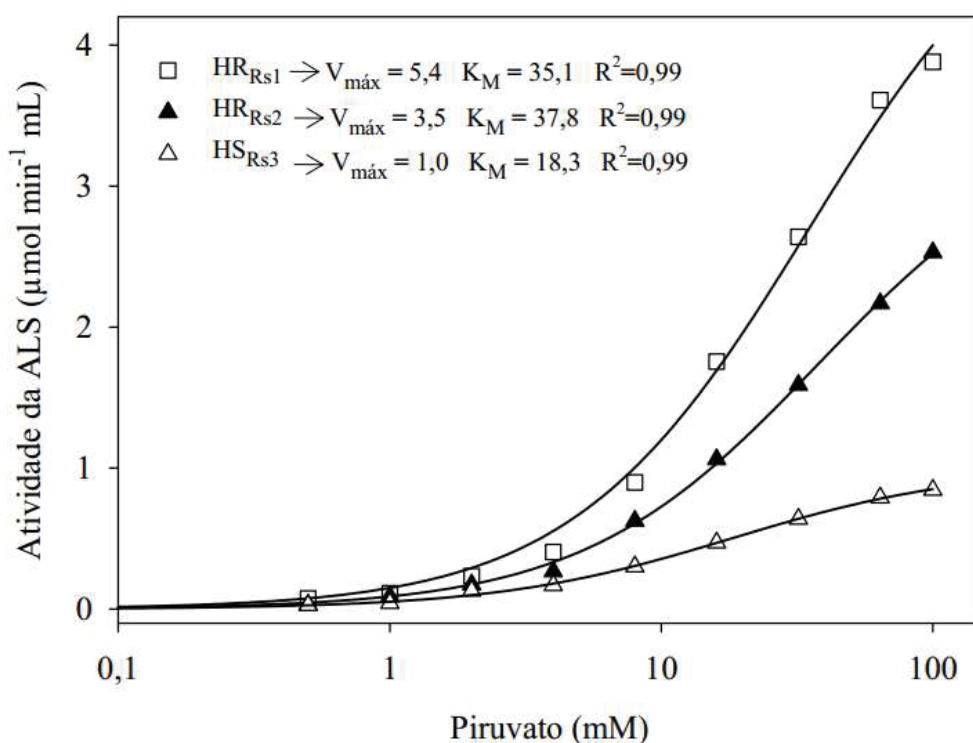


Figura 14 - Atividade da enzima ALS em função de diferentes concentrações de piruvato em três populações de *R. sativus*, sendo duas populações resistentes (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e uma suscetível (HS<sub>Rs3</sub>) ao herbicida metsulfurom-metil.  $K_M$  = Concentração de piruvato que fornece a velocidade inicial igual a metade da velocidade máxima de reação;  $V_{máx}$  = Velocidade máxima de reação.

Estudos também demonstram que em muitos casos de resistência envolvendo mutação no sítio de ação do herbicida, não há mudanças na atividade enzimática. Em *Conyza sumatrensis* não se observou diferenças nos parâmetros cinéticos da enzima ALS (SANTOS et al., 2014), assim como em *Lactuca serriola* (PRESTON et al., 2006). Em *Poa annua*, contendo a mutação Trp-574-Leu, não houve alteração nos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  (CROSS et al., 2015).

Mudanças nos parâmetros enzimáticos foram observadas para outros herbicidas, portando mutações no sítio de ação, exemplo: substituição de aminoácido na EPSPs resultou em ineficiência catalítica da enzima (HEALY-FRIED et al., 2007). Em *Lolium rigidum*, resistente aos herbicidas inibidores da ACCase, se observou redução na atividade enzimática (YU et al., 2007; VILA-AIUB et al., 2015). Valores da atividade cinética da EPSPs ( $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_M$ ) incrementaram mais que o dobro em biótipos resistentes ao glifosato de *Amaranthus tuberculatus* comparados ao biótipo suscetível, indicando que a amplificação do gene EPSPs contribuiu para valores altos de resistência (LORENTZ et al., 2014).

#### 4.4.3 Metabolização do citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase

Nos resultados obtidos com o experimento de metabolização do citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase, não houve significância em relação ao controle e redução de matéria seca da parte aérea (MSPA) nas populações resistentes quando comparadas as aplicações do herbicida metsulfurom-metil isolado e em combinação com malation (Tabela 9). Isso se repetiu em ambas as espécies. Quando comparados os tratamentos entre herbicida isolado, herbicida associado ao malation e testemunha (sem herbicida), há diferença significativa em algumas populações em relação a testemunha, mas não entre as populações resistentes. As populações resistentes diferiram em relação a testemunha, dentro de um mesmo tratamento, em relação aos parâmetros avaliados, sendo que o herbicida metsulfurom-metil controlou eficientemente as populações suscetíveis das duas espécies chegando próximo a 100% de controle e zero de MSPA.

Resistência com metabolização tem sido mais frequentemente em espécies de plantas daninhas gramíneas do que em espécies de folhas largas (WERCK-REICHHART; HEHN; DIDIERJEAN, 2000; BECKIE; TARDIF, 2012). Não há grande número de casos de resistência envolvendo mecanismos que não seja por mutação do sítio de ação para herbicidas ALS. Mas dentre esses mecanismos, a resistência metabólica através do complexo P<sub>450</sub> monooxigenase, é a mais comum (YU; POWLES, 2014). Em muitas vezes, a resistência metabólica é assumida através da identificação de biótipos resistentes, mas com a ALS sensível ou ausência de mutações de resistência conhecidas na enzima, tendo como exemplo *Lolium rigidum*, *Bromus rigidus*, *Avena fatua* e *Papaver rhoeas* (YU et al., 2009; DÉLYE; PERNIN; SCARABEL, 2011; OWEN; GOGGIN; POWLES, 2012; BECKIE; WARWICK; SAUDER, 2012a).

O acúmulo de dois mecanismos de resistência (sítio de ação alterado e metabolização pelo complexo P<sub>450</sub>) tem sido relatado em *Lolium rigidum* e *Alopecurus myosuroides* (POWLES; YU, 2010; YU; POWLES, 2014). Através desses resultados é possível afirmar que não há envolvimento do complexo citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase na resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS. Também pode-se correlacionar a resistência, dessas populações em estudo, a mudança de aminoácido na posição 574 de Trp para Leu, podendo ou não estar associado a mudanças dos parâmetros enzimáticos da enzima ALS.

Tabela 9- Controle (%) e matéria seca da parte aérea (MSPA) aos 30 dias após aplicação (DAA) de metsulfurom-metil, isolado ou antecedido em 30 minutos da aplicação de malation (inibidor do citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase) e, testemunha sem nenhuma aplicação

<i>R. raphanistrum</i> - Controle (%)				
Tratamento	HR <sub>Rr1</sub>	HR <sub>Rr2</sub>	HS <sub>Rr3</sub>	
Metsulfurom-metil + malation	0 <sup>ns</sup> B	0 <sup>ns</sup> B	97,5	aA
Metsulfurom-metil	0 B	0 B	98,8	aA
Testemunha	0 <sup>NS</sup>	0 -	0	b
CV (%)	1,44			
Tratamento	MSPA (g)			
Metsulfurom-metil + malation	6,53 abB	6,23 abB	0,50	aA
Metsulfurom-metil	5,52 aB	5,48 aB	0,30	aA
Testemunha	6,93 b <sup>NS</sup>	6,67 b	7,15	b
CV (%)	5,06			
<i>R. sativus</i> – Controle (%)				
Tratamento	HR <sub>Rs1</sub>	HR <sub>Rs2</sub>	HS <sub>Rs3</sub>	
Metsulfurom-metil + malation	0 <sup>ns</sup> C	4,5 aB	98,5	aA
Metsulfurom-metil	0 C	4,5 aB	99,2	aA
Testemunha	0 <sup>NS</sup>	0 b	0	b
CV (%)	4,36			
Tratamento	MSPA (g)			
Metsulfurom-metil + malation	6,72 <sup>ns</sup> C	5,13 <sup>ns</sup> B	0,28	aA
Metsulfurom-metil	7,37 C	5,01 B	0,11	aA
Testemunha	7,21 B	5,84 A	6,85	bB
CV (%)				

<sup>ns</sup> Não significativo na coluna. <sup>NS</sup> Não significativo na linha. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e letra maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 4.5 Conclusões

As populações HR<sub>Rf1</sub>, HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub> possuem elevado nível de resistência ao herbicida imazapic, exceto a população HR<sub>Rf2</sub>, que se caracterizou com baixo nível de resistência. As populações HS<sub>Rf3</sub> e HS<sub>Rs3</sub> são altamente suscetíveis a esse herbicida.

A resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* altera os parâmetros cinéticos da enzima ALS, caracterizando baixa afinidade do substrato (piruvato) pela enzima e maior  $V_{\text{máx}}$  nas populações resistentes.

Não há envolvimento do complexo citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase na resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS.

## 5 CAPÍTULO III

Herança da resistência e controle alternativo de *Raphanus raphanistrum* e *R. sativus* portadores da mutação Trp-574-Leu na acetolactato sintase (ALS)

### 5.1 Resumo

O uso intensivo de herbicidas inibidores da ALS, nas culturas de inverno, tem proporcionado pressão de seleção em populações de *Raphanus raphanistrum* e *R. sativus* selecionando resistência a esses herbicidas. Objetivou-se com essa pesquisa, verificar a existência de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS, em populações resistentes de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, portadores da mutação Trp-574-Leu; Indicar o manejo químico alternativo e determinar a herança da resistência na geração F1. Os herbicidas utilizados foram: iodosulfurom-metil, atrazina, nicossulfurom, 2,4-D, glifosato, imazetapir, carfentrazone, saflufenacil, metsulfurom-metil, bentazona, flumioxazina, glufosinato de amônio, piroxsulam e tembotriona. Para avaliar a herança da resistência realizou-se cruzamentos entre cada população, utilizando plantas resistentes e suscetíveis. Para a seleção de progênie no F1 aplicou-se o herbicida metsulfurom-metil. As populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus* possuem resistência cruzada aos herbicidas pertencentes aos grupos químicos sulfonilureias, imidazolinonas e triazolopirimidinas. Os herbicidas atrazina, 2,4-D, glifosato, saflufenacil, bentazona, flumioxazina, glufosinato de amônia e tembotriona são alternativas para o manejo da resistência nessas populações. A herança da resistência nas espécies *R. raphanistrum* e *R. sativus* é dominante e nuclear visto que não foi observado efeito materno na progênie.

Palavras-chave: 1. Controle químico. 2. Cruzamentos sexuais em nabo. 3. Mecanismo de ação. 4. Resistência cruzada.

### 5.2 Introdução

Nabiça ou nabo (*Raphanus raphanistrum* L. e *R. sativus* L.) são plantas daninhas cosmopolitas em várias culturas devido à alta capacidade reprodutiva e adaptações a uma ampla variedade de habitats (WARWICK; FRANCIS, 2005). Ambas as espécies são descritas como anuais ou bianuais de inverno, podendo germinar também no verão, sendo

consideradas espécies facultativas. A presença dessas duas espécies na cultura do milho, soja e, principalmente, em culturas de inverno como trigo e cevada, constitui-se fator negativo na produtividade, pois são plantas daninhas de elevada capacidade competitiva (KISSMANN; GROTH, 1999, p. 535; ESLAMI et al., 2006; RIGOLI et al., 2008; BIANCHI et al., 2011; COSTA; RIZZARDI, 2015). Além disso, essas espécies têm sido relatadas como resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) em cultivos de cereais de inverno no Sul do Brasil, tornando-as ainda mais competitivas através da seleção com esses herbicidas (THEISEN, 2008; COSTA; RIZZARDI, 2014).

É crescente o relato de resistência a herbicidas em *Raphanus* spp. Resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS em *R. raphanistrum* já foi documentada em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil (HASSHEM et al., 2001a; SMIT; CAIRNS, 2001; COSTA; RIZZARDI, 2013). Também há casos de resistência múltipla a vários mecanismos de ação herbicida (HASSHEM et al., 2001b; WALSH et al., 2004; ASHWORTH et al., 2014). Já *R. sativus* possui apenas relatos de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS (THEISEN, 2008; PANDOLFO et al., 2016; HEAP, 2017; CECHIN et al., 2017).

ALS, também conhecida como aceto-hidroxiácido sintase (AHAS), é a primeira enzima na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina, valina e leucina. De maneira geral, os herbicidas inibidores da ALS, agem bloqueando o acesso do substrato (piruvato) ao sítio ativo da enzima, o que causa a inanição desses aminoácidos, consequentemente, morte da planta (DUGGLEBY; McCOURT; GUDDAT, 2008). Cinco grupos químicos de herbicidas, comercialmente disponíveis, têm como sítio de ação a enzima ALS: sulfonilureias (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), pirimidinilbenzoatos (PB) e sulfonilaminocarboniltriazolinona (SACT) (SHANER, 1999; MALLORY-SMITH; RETZINGER, 2003). Esses herbicidas são amplamente utilizados devido sua baixa toxicidade para mamíferos, seletividade a um grande número de culturas, efetivo em baixas doses e com excelente eficiência no controle de plantas daninhas (DUGGLEBY; PANG, 2000).

Maioria dos casos de resistência de plantas daninhas a esses herbicidas é devido à redução da sensibilidade no sítio de ação, conferido por uma ou várias mutações dentro do gene ALS (TRANEL; WRIGHT, 2002; YU; POWLES, 2014). Até o momento já foram relatadas muitas mutações no gene ALS, dotando resistência a herbicidas em plantas daninhas (DÉLYE; JASIENIUK; Le CORRE, 2013; HEAP, 2017). Em *R. raphanistrum* e *R. sativus* a substituição de aminoácidos na acetolactato sintase é a principal forma de resistência aos herbicidas inibidores da ALS. Em *R. raphanistrum* já foram relatadas as alterações dos aminoácidos Pro197 para Leu, Ala, His e Ser, Trp574 para Leu, Ala122 para Tyr e Asp376 para Glu, como causas de resistência a herbicidas (TAN; MEDD, 2002; YU et al., 2003; HAN et al., 2012; YU et al., 2012). Em *R. sativus*, a alteração do aminoácido Trp574 para Leu é a única mutação documentada (PANDOLFO et al., 2016; CECHIN et al., 2017). A substituição do aminoácido Trp-574-Leu é a mais comum nas duas espécies, tendo como consequência a resistência aos herbicidas inibidores da ALS.

O padrão da resistência aos herbicidas ALS, devido a sítio de ação alterado, varia de acordo com a substituição de aminoácido existente no gene. Por exemplo, a substituição de Trp-574-Leu confere alto nível de resistência a todas as famílias de herbicidas inibidores de ALS em muitas espécies de plantas daninhas (BECKIE; WARWICK; SAUDER, 2012a; POWLES; YU, 2010). Substituições de aminoácidos Ala122, Ala205 e Ser653 conferem resistência às imidazolinonas, mas em baixo nível de resistência às sulfoniluréias (POWLES; YU, 2010), com exceção da substituição Ala-122-Tyr, que confere alto nível de resistência a ambos os grupos químicos ALS (HAN et al. 2012). Substituições em Pro197 conferem resistência às sulfoniluréias, mas um baixo nível de resistência às imidazolinonas (PARK; MALLORY-SMITH, 2004; POWLES; YU, 2010; WHALEY; WILSON; WESTWOOD, 2007).

O controle de plantas daninhas resistentes é o maior desafio de produtores em áreas afetadas. O manejo mais comum e aceito para controlar plantas daninhas resistentes, além da utilização de práticas integradas, é a utilização de herbicidas pertencentes a outros mecanismos de ação. Para tal fim, é importante conhecer bem o mecanismo herbicida utilizado e se há ou não evolução à resistência múltipla (WALSH; POWLES, 2014;



OWEN et al., 2015). Herbicidas inibidores de EPSPs, mimetizadores de auxinas, inibidores de fotossistema II, inibidores de fotossistema I, inibidores de protox e inibidores de HPPD podem ser alternativas para o controle de *Raphanus* spp. resistentes aos herbicidas inibidores da ALS (HASHEM et al., 2001b; WALSH et al., 2004; ASHWORTH et al., 2014).

Apesar de práticas agronômicas influenciarem na seleção de resistência a herbicidas, fatores ligados a genética e biologia da planta daninha tem papel importante na evolução da resistência a herbicidas. Dentre estes fatores está a frequência inicial de indivíduos resistentes na população, dominância dos genes que proporcionam resistência e tipo de fecundação. Estudos sobre a herança genética da resistência em populações, onde mutações no gene ALS são especificadas, indicam que a resistência aos herbicidas ALS, por sitio de ação alterado, é controlada por um gene nuclear com grau variável de dominância (KOLKMAN et al., 2004; SCARABEL, et al., 2004; ASHIGH; RAJCAN; TARDIF, 2008; YU; POWLES, 2014).

O tipo de herança é um aspecto importante no estabelecimento da resistência em uma população de plantas daninhas. Existem dois tipos de herança: a citoplasmática e a nuclear. Herança citoplasmática é aquela em que os caracteres hereditários são transmitidos via citoplasma; assim, somente a planta mãe transmitirá a resistência para os descendentes. Por outro lado, se a herança for nuclear, tanto o pai quanto a mãe podem transmiti-la (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001). Portanto, estudar a hereditariedade e transmissão das características de resistência a herbicidas se torna importante.

Diante disso, levanta-se a hipótese que populações resistentes de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, portadores da mutação Trp-574-Leu, possuam resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS e que outros herbicidas, de diferentes mecanismos de ação, sejam eficientes no controle dessas espécies resistentes. Também cria-se a hipótese de que a herança da resistência nessas populações em estudo possua caráter dominante. O objetivo dessa pesquisa foi verificar a existência de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS, indicar manejo químico alternativo para o controle de plantas

resistentes e determinar a herança da resistência na geração F1 a partir de cruzamentos entre populações resistentes e suscetíveis.

### 5.3 Material e Métodos

As populações das duas espécies (*R. raphanistrum* e *R. sativus*) foram coletadas e conduzidas conforme descrito no capítulo I, assim como a purificação das populações para a homozigose da resistência através de autopolinização. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Universidade de Passo Fundo (UPF), no ano de 2016.

Para a realização do experimento, no qual testou herbicidas de vários mecanismos de ação para controle das populações em estudo, utilizou-se sementes oriundas de cada população homozigota para a resistência (*R. raphanistrum* - HR<sub>Rf1</sub> e HR<sub>Rf2</sub>; *R. sativus* - HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e homozigota para suscetibilidade ao herbicida metsulfurom-metil (*R. raphanistrum* - HS<sub>Rs3</sub>; *R. sativus* - HS<sub>Rs3</sub>). Essas sementes foram semeadas em bandejas de isopor e, após a germinação, transplantadas em vasos plásticos (três plantas por vaso) de 17 cm de diâmetro e 14 cm de altura, com capacidade volumétrica de 2,5 L, perfazendo área superficial de 0,0453 m<sup>2</sup>, preenchidos com substrato comercial do tipo Turfa Fértil®. Quando a maioria das plantas atingiram o estágio de desenvolvimento de três a quatro folhas verdadeiras, os vasos foram retirados da casa de vegetação para realizar a aplicação dos herbicidas. Para isso, utilizou-se pulverizador costal de precisão pressurizado a CO<sub>2</sub>, pontas jato plano XR 110.02, na altura de 50 cm acima do dossel das plantas, com pressão de trabalho a 2 kgf cm<sup>-2</sup> e volume de aplicação de 200 L ha<sup>-1</sup>.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3 x 15 completamente casualizado, com quatro repetições. O fator A compreendeu as populações, separados por espécie, onde cada espécie compõe experimento separado (*R. raphanistrum* - HR<sub>Rf1</sub>, HR<sub>Rf2</sub> e HS<sub>Rs3</sub>; *R. sativus* - HR<sub>Rs1</sub>, HR<sub>Rs2</sub> e HS<sub>Rs3</sub>, seguindo a nomenclatura da Tabela 1 do Cap. I) e o fator B compreendeu 14 tratamentos herbicidas de diferentes mecanismos de ação e suas respectivas doses comerciais mais um tratamento sem herbicida, sendo a testemunha. Os tratamentos utilizados foram: Sem aplicação de herbicida (testemunha),

iodosulfurom-metil (5 g i.a. ha<sup>-1</sup>), atrazina (2500 g i.a. ha<sup>-1</sup>), nicossulfurom (56 g i.a. ha<sup>-1</sup>), 2,4-D (1209 g e.a. ha<sup>-1</sup>), glifosato (960 g e.a. ha<sup>-1</sup>), imazetapir (106 g i.a. ha<sup>-1</sup>), carfentrazona (20 g i.a. ha<sup>-1</sup>), saflufenacil (35 g i.a. ha<sup>-1</sup>), metsulfurom-metil (2,4 g i.a. ha<sup>-1</sup>), bentazona (720 g i.a. ha<sup>-1</sup>), flumioxazina (60 g i.a. ha<sup>-1</sup>), glufosinato de amônio (400 g i.a. ha<sup>-1</sup>), piroxsulam (18 g i.a. ha<sup>-1</sup>) e tembotriona (100 g i.a. ha<sup>-1</sup>). Para todos os tratamentos herbicidas utilizou-se o adjuvante e dose conforme recomendação do fabricante do formulado comercial.

Avaliou-se visualmente o controle das populações aos 14 e 30 dias após aplicação (DAA) dos herbicidas. Para controle utilizou-se como base a escala percentual, em que a nota 0% correspondeu a nenhum efeito do herbicida e a nota 100% significou morte completa das plantas. Avaliação de matéria seca da parte aérea (MSPA) realizou-se aos 30 DAA, sendo as plantas cortadas rente ao solo e secas em estufa a 65 °C por 72 horas, até peso constante. Os valores de MSPA foram transformados para percentuais, partindo-se do princípio de que as parcelas que permaneceram sem aplicação de herbicida possuem 100% de MSPA e as demais possuem percentuais desta biomassa, em consequência da redução imposta pelos herbicidas (BECKIE; WARWICK; SAUDER, 2012b). Os dados relativos ao percentual de controle e de MSPA foram analisados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk), transformados ( $y = \sqrt{x + 1}$ ) e, posteriormente, submetidos à análise de variância. Quando significativos, realizou-se o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para o experimento herança da resistência, utilizou-se sementes oriundas de cruzamentos entre populações resistentes e suscetíveis de *R. raphanistrum* e entre populações resistentes e suscetíveis de *R. sativus* (Tabela 10). Para obtenção de híbridos, realizou cruzamentos recíprocos entre as populações dentro de cada espécie. Também conduziu-se, para cada população suscetível dentro de cada espécie, plantas autopolinizadas para ser utilizadas como controle. As siliquis foram identificadas de acordo com o cruzamento realizado para posterior colheita. As sementes oriundas desses cruzamentos foram identificadas e semeadas em bandejas conforme descrito anteriormente. As plântulas foram transplantadas para vasos plásticos de 26 cm de diâmetro e 20 cm de altura, com capacidade volumétrica de 10,6 L, perfazendo área

superficial de 0,0531 m<sup>2</sup>, preenchidos com substrato comercial do tipo Turfa Fértil<sup>®</sup>. Em cada vaso cultivou-se de 6 a 8 plantas, todas oriundas dos mesmos genitores. Ao atingir 3 a 4 folhas verdadeiras, pulverizou-se o herbicida metsulfurom-metil, na dose de 2,4 g i.a. ha<sup>-1</sup>. A contagem de plantas foi feita no momento da aplicação e aos 30 DAA, quando se realizou o corte rente ao solo para avaliar a MSPA. Avaliou-se o número de plantas sobreviventes e a MSPA média por planta em gramas (g).

Tabela 10- Cruzamento entre populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, resistentes (HR<sub>Rr1</sub>, HR<sub>Rr2</sub>, HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e suscetíveis (HS<sub>Rr3</sub> e HS<sub>Rs3</sub>) aos herbicidas inibidores da ALS

Cruzamentos	
<i>R. raphanistrum</i>	<i>R. sativus</i>
HR <sub>Rr1</sub> ♀ x HS <sub>Rr3</sub> ♂	HR <sub>Rs1</sub> ♀ x HS <sub>Rs3</sub> ♂
HR <sub>Rr2</sub> ♀ x HS <sub>Rr3</sub> ♂	HR <sub>Rs2</sub> ♀ x HS <sub>Rs3</sub> ♂
HS <sub>Rr3</sub> ♀ x HR <sub>Rr1</sub> ♂	HS <sub>Rs3</sub> ♀ x HR <sub>Rs1</sub> ♂
HS <sub>Rr3</sub> ♀ x HR <sub>Rr2</sub> ♂	HS <sub>Rs3</sub> ♀ x HR <sub>Rs2</sub> ♂
HS <sub>Rr3</sub> ♀	HS <sub>Rs3</sub> ♀

♂ = doador de pólen (pai); ♀ = doador de citoplasma (mãe); ♀ = autopolinizado.

#### 5.4 Resultados e Discussão

A análise de variância foi significativa ( $p \leq 0,1$ ) para todas as variáveis analisadas, com interação significativa para populações versus herbicidas em relação a controle e MSPA. Essa afirmação é válida para as duas espécies. O resultado do controle exercido pelos herbicidas avaliados em *R. raphanistrum* variou entre as populações resistentes e suscetível aos herbicidas ALS (Tabela 11 e Figura 15). Os herbicidas atrazina, saflufenacil, bentazona, flumioxazina e tembotriona controlaram em 100% todas as populações, mas não diferiram significativamente dos herbicidas 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio, aos 14 e 30 DAA. Todos os herbicidas inibidores da ALS obtiveram baixo desempenho no controle das populações resistentes. Na população suscetível, aos 30 DAA, todos os tratamentos herbicidas alcançaram entre 94 e 100% de

controle, exceto carfentrazona com 85%, mas que não diferiu estatisticamente dos demais.

Tabela 11- Controle (%) de populações de *Raphanus raphanistrum*, resistentes portadores da mutação Trp-574-Leu (HR<sub>Rf1</sub> e HR<sub>Rf2</sub>) e suscetível (HS<sub>Rf3</sub>) aos herbicidas inibidores da ALS, 14 e 30 dias após aplicação (DAA)

Herbicidas	Dose (g ha <sup>-1</sup> ) (i.a./e.a.)	14 DAA			30 DAA		
		HR <sub>Rf1</sub>	HR <sub>Rf2</sub>	HS <sub>Rf3</sub>	HR <sub>Rf1</sub>	HR <sub>Rf2</sub>	HS <sub>Rf3</sub>
		-----%-----					
Sem herbicida	-	0 f	0 e	0 d	0 e	0 c	0 b
Iodosulfurom	5	B 49 c	C 9 bc	A 70 c	B 15 b	C 0 c	A 98 a
Atrazina	2500	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Nicossulfuron	56	B 5 ef	B 7 cd	A 77 bc	B 0 e	B 0 c	A 94 a
2,4-D	1209	97 a	96 a	93 ab	98 a	97 a	97 a
Glifosato	960	98 a	92 a	97 ab	99 a	91 a	98 a
Imazetapir	106	B 62 b	C 13 b	A 97 ab	B 13 bc	C 0 c	A 100 a
Carfentrazona	20	A 94 a	A 95 a	B 78 bc	83 a	94 a	85 a
Saflufenacil	35	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Metsulfurom	2,4	B 12 d	B 15 b	A 96 ab	B 8 cd	B 5 b	A 99 a
Bentazona	720	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Flumioxazina	60	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Glufosinato	400	92 a	94 a	99 a	B 86 a	A 93 a	A 100 a
Piroxulam	18	B 6 e	C 3 de	A 89 abc	B 8 d	C 0 c	A 96 a
Tembotriona	100	100 a	99 a	99 a	100 a	100 a	100 a
<b>F</b> <sub>Populações</sub>		352,008 **			770,029 **		
<b>F</b> <sub>Tratamentos</sub>		500,478 **			612,804 **		
<b>C.V.</b> (%)		5,65			5,77		
<b>DMS</b> <sub>Populações <i>R. raphanistrum</i></sub>		0,747			0,731		
<b>DMS</b> <sub>Tratamentos</sub>		1,088			1,065		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, comparadas na mesma data de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; \*\* Significativo com  $p \leq 0,01$ ; Dados transformados para  $(\sqrt{x + 1})$ .

A ação dos herbicidas em estudo em relação ao controle foi semelhante na espécie *R. sativus*. Atrazina, saflufenacil, bentazona, flumioxazina e tembotriona obtiveram controle entre 99 e 100% de todas as populações aos 30 DAA, mas não diferiram estatisticamente dos herbicidas 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônia. Já os herbicidas inibidores da ALS demonstraram baixo desempenho de controle nas populações resistentes. Não houve diferença significativa entre os demais herbicidas no controle da população suscetível de *R. sativus*, alcançando valores entre 95 e 100% aos 30 DAA (Figura 15 e Tabela 12).

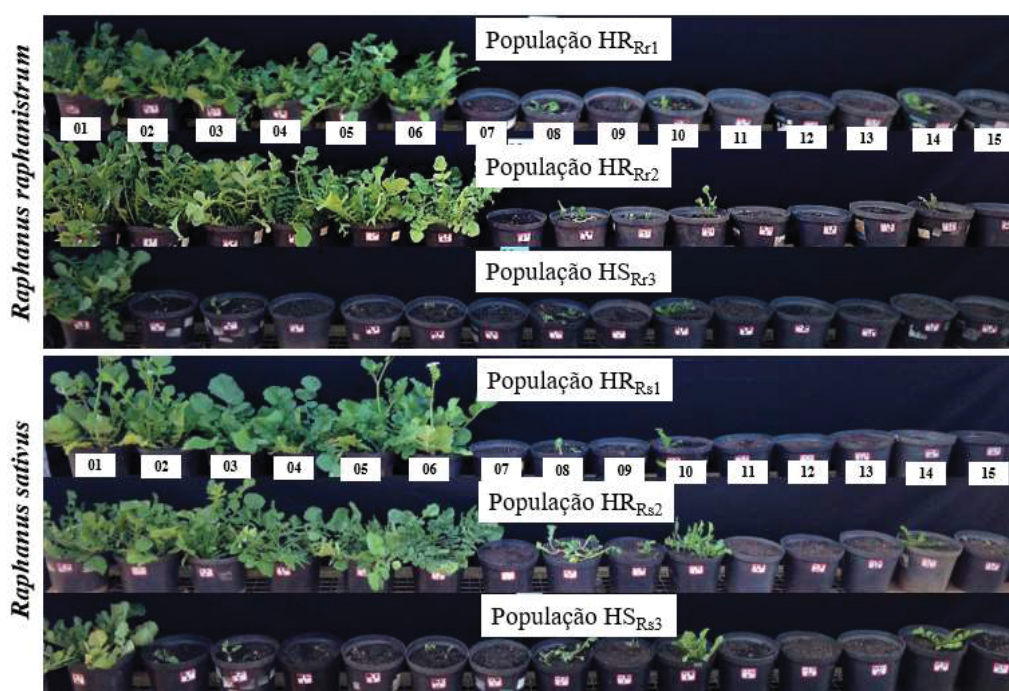


Figura 15 - Controle de populações de *R. raphanistrum* ( $HR_{R1}$  e  $HR_{R2}$  – mutação Trp-574-Leu,  $HS_{R3}$  - suscetível) e *R. sativus* ( $HR_{RS1}$  e  $HR_{RS2}$  – mutação Trp-574-Leu,  $HS_{RS3}$  - suscetível) aos 30 dias após aplicação dos herbicidas. Tratamentos: 01- sem herbicida, 02- iodossulfurom-metil, 03- nicossulfuron, 04- imazetapir, 05- metsulfurom-metil, 06- piroxsulán, 07- atrazina, 08- 2,4-D, 09- glifosato, 10- carfentrazone, 11- saflufenacil, 12- bentazona, 13- flumioxazina, 14- glufosinato, 15- tembotriona. Todos os vasos seguem a mesma sequência de numeração.

Tabela 12- Controle (%) de populações de *Raphanus sativus*, resistentes portadores da mutação Trp-574-Leu (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e suscetível (HS<sub>Rs3</sub>) aos herbicidas inibidores da ALS, 14 e 30 dias após aplicação (DAA)

Herbicidas	Dose (g ha <sup>-1</sup> ) (i.a./e.a.)	14 DAA			30 DAA		
		HR <sub>Rs1</sub>	HR <sub>Rs2</sub>	HS <sub>Rs3</sub>	HR <sub>Rs1</sub>	HR <sub>Rs2</sub>	HS <sub>Rs3</sub>
		-----%					
Sem herbicida	-	0 b	0 f	0 d	0 b	0 e	0 b
Iodosulfurom	5	C 0 b	B 8 e	A 51 bc	C 0 b	B 4 d	A 99 a
Atrazina	2500	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Nicossulfuron	56	C 0 b	B 5 e	A 49 c	B 0 b	B 0 e	A 95 a
2,4-D	1209	97 a	96 ab	96 a	99 a	95 a	96 a
Glifosato	960	98 a	98 a	98 a	99 a	96 a	99 a
Imazetapir	106	C 0 b	B 19 c	A 53 bc	C 0 b	B 25 c	A 100 a
Carfentrazona	20	A 97 a	B 83 b	B 87 a	A 98 a	C 69 b	B 88 a
Saflufenacil	35	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Metsulfurom	2,4	C 0 b	B 13 d	A 54 bc	C 0 b	B 4 d	A 99 a
Bentazona	720	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Flumioxazina	60	100 a	100 a	100 a	100 a	99 a	100 a
Glufosinato	400	98 a	96 ab	93 a	A 99 a	B 88 a	A 92 a
Piroxsulam	18	B 0 b	B 0 f	A 60 b	B 0 b	B 0 e	A 98 a
Tembotriona	100	98 a	97 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<b>F</b> <sub>Populações</sub>			795,447 **			1847,803 **	
<b>F</b> <sub>Tratamentos</sub>			1635,664 **			1443,5891 **	
<b>C.V. (%)</b>			4,05			3,91	
<b>DMS</b> <sub>Populações <i>R. sativus</i></sub>			0,494			0,490	
<b>DMS</b> <sub>Tratamentos</sub>			0,719			0,714	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, comparadas na mesma data de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; \*\* Significativo com  $p \leq 0,01$ ; Dados transformados para  $(\sqrt{x + 1})$ .

O herbicida carfentrazona proporcionou o menor valor de controle na população HR<sub>Rs2</sub> entre os herbicidas inibidores de outros mecanismos de ação, exceto ALS, aos 14 e 30 DAA. Esse resultado mostra que este herbicida pode não ser opção de controle para

essa população resistente. Todos os herbicidas inibidores da ALS aos 14 DAA demonstraram menor grau de controle em relação as populações suscetíveis das duas espécies, mas aos 30 DAA não diferiram dos demais, obtendo excelente controle. Isso deve-se ao fato de que os herbicidas inibidores da ALS agem na interrupção da síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, matando a planta pela falta de proteínas nas células, agindo nos tecidos jovens, portanto, possuem ação lenta de controle (SHANER; SINGH, 1993; ZHOU et al., 2007).

A porcentagem de MSPA após a aplicação dos herbicidas variou entre as populações resistentes e suscetíveis de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, principalmente em relação aos herbicidas inibidores da ALS (Tabela 13). A porcentagem de MSPA das plantas tratadas com os herbicidas iodosulfurom-metil, nicossulfuron, metsulfurom-metil, imazetapir e pyroxsulam estiveram muito próximas da produção de MSPA das plantas não tratadas com herbicida. Os herbicidas atrazina, saflufenacil, bentazona, flumioxazina e tembotriona não diferiram significativamente entre si, obtendo ótimo controle de populações resistentes e suscetíveis nas duas espécies. Os herbicidas 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônia diferiram em algumas populações, mas de modo geral, reduziram a MSPA para menos de 10%. O herbicida carfentrazone reduziu a MSPA na população HR<sub>RS2</sub> significativamente inferior aos herbicidas pertencentes a outros mecanismos de ação, exceto os inibidores da ALS. Os herbicidas inibidores da ALS reduziram a MSPA apenas nas populações suscetíveis HS<sub>RF3</sub> e HS<sub>RS3</sub> para a faixa de 0 e 7%.

O controle ineficiente exercido pelos herbicidas inibidores da ALS (iodosulfurom-metil, nicossulfuron, metsulfurom-metil, imazetapir e piroxsulam) em relação às populações resistentes e, controle eficiente na população suscetível, persistindo aos 14 e 30 DAA, demonstra que populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, portadores da mutação Trp-574-Leu possuem resistência cruzada aos grupos químicos sulfonilureias (SU), imidazolinonas (IMI) e triazolopirimidinas (TP). Esses resultados são firmados através da baixa efetividade que esses herbicidas demonstraram na redução de MSPA nas populações resistentes. Já os herbicidas atrazina, 2,4-D, glifosato, saflufenacil, bentazona, flumioxazina, glufosinato de amônio e tembotriona apresentam-se como alternativa



eficaz para o manejo de resistência nessas duas espécies. Isso demonstra que não há resistência múltipla a esses mecanismos de ação trabalhados.

Tabela 13- Matéria seca da parte aérea (%) de *Raphanus raphanistrum* (HR<sub>Rf1</sub> e HR<sub>Rf2</sub> - mutação Trp-574-Leu, HS<sub>Rf3</sub> - suscetível) e *Raphanus sativus* (HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub> - mutação Trp-574-Leu, HS<sub>Rs3</sub> - suscetível) 30 dias após aplicação (DAA) dos herbicidas

Herbicidas	Dose (g ha <sup>-1</sup> ) (i.a./e.a.)	<i>R. raphanistrum</i>			<i>R. sativus</i>		
		HR <sub>Rf1</sub>	HR <sub>Rf2</sub>	HS <sub>Rf3</sub>	HR <sub>Rs1</sub>	HR <sub>Rs2</sub>	HS <sub>Rs3</sub>
-----%-----							
Sem herbicida	-	100 d	100 e	100 e	100 b	100 e	100 c
Iodosulfurom	5	B 82 c	C 93 de	A 2 ab	B 97 b	B 98 e	A 0 a
Atrazina	2500	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Nicossulfuron	56	B 98 d	B 97 de	A 7 cd	C 100 b	B 95 e	A 4 ab
2,4-D	1209	4 d	6 b	5 bcd	A 3 a	B 10 c	A 5 ab
Glifosato	960	1 d	3 ab	1 ab	1 a	2 ab	1 a
Imazetapir	106	B 84 c	C 91 cde	A 0 a	C 99 b	B 62 d	A 0 a
Carfentrazona	20	C 14 b	A 3 ab	B 9 d	A 1 a	C 57 d	B 10 b
Saflufenacil	35	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Metsulfurom	2,4	C 95 d	B 87 cd	A 1 ab	C 96 b	B 92 e	A 0 a
Bentazona	720	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Flumioxazina	60	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Glufosinato	400	C 9 b	B 3 ab	A 0 a	A 1 a	B 7 bc	A 2 a
Piroxsulam	18	C 91 cd	B 83 c	A 3 abc	B 98 b	B 100 e	A 3 a
Tembotriona	100	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
<b>F</b> <sub>Populações</sub>		2132,707 **			1267,285 **		
<b>F</b> <sub>Tratamentos</sub>		1656,657 **			803,838 **		
<b>C.V. (%)</b>		3,55			5,20		
<b>DMS</b> <sub>Populações <i>R. sativus</i></sub>		0,093			0,140		
<b>DMS</b> <sub>Tratamentos</sub>		0,135			0,205		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, comparadas na mesma data de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; \*\* Significativo com  $p \leq 0,01$ ; Dados transformados para  $(\sqrt{x + 1})$ .

Esses resultados corroboram com Yu et al. (2012) onde constataram que a aplicação de herbicidas inibidores da enzima ALS, pertencentes às IMI, SU e TP, em populações resistentes de *R. raphanistrum* portadores da mutação Trp-574-Leu, não proporcionaram controle satisfatório, demonstrando resistência cruzada a esses grupos químicos. Populações de *R. raphanistrum*, portando essa mesma mutação, constatou-se resistência cruzada a todas as classes de herbicidas inibidores da ALS (TAN; MEDD, 2002). O gene ALS de *Bidens subalternans* foi sequenciado e identificou-se a mutação Trp-574-Leu como precursor da resistência a essas três classes de herbicidas inibidores da ALS (LAMEGO et al., 2009). Em populações de *Conyza canadensis* a resistência cruzada aos grupos químicos IMI e SU foi constatada devido a substituição de Trp574 para Leu (MATZRAFI et al., 2015). Costa e Rizzardí (2013) observaram em trabalhos preliminares com a população HR<sub>Rf1</sub> (*R. raphanistrum*) que havia resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS (IMI, SU e TP).

Ao investigarem o mecanismo de resistência em *R. sativus* Pandolfo et al. (2016) documentaram a mutação Trp-574-Leu como causa de resistência cruzada a todos os grupos químicos dos herbicidas inibidores da ALS. O herbicida mimetizador de auxina (benazolin) foi eficiente no controle pós emergência de populações resistentes e suscetíveis de *R. sativus*. Theisen (2008) ao testar biótipos de *R. sativus*, observou resistência cruzada aos herbicidas clorimurrom-etil, metsulfurom-metil, cloransulam-metil e imazetapir. Já os herbicidas bentazona, 2,4-D e glifosato foram eficientes no controle dessas populações. Recentemente, Cechin et al. (2017) observaram resistência cruzada aos herbicidas iodosulfurom-metil e imazetapir em populações de *R. sativus* devido a mutação Trp-574-Leu.

Resultados a partir de plantas F1, oriundas dos cruzamentos de população suscetível com populações resistentes, demonstraram alta taxa de sobrevivência após a aplicação do herbicida metsulfurom-metil (Tabela 14). Tanto nos cruzamentos entre populações de *R. raphanistrum*, como em cruzamentos entre populações de *R. sativus*, a produção de MSPA média por planta demonstrou que o herbicida pouco afetou o desenvolvimento, sendo que a população suscetível e autopolinizada (sem presença de alelos de resistência) a MSPA foi igual a zero, ou seja, 100% de morte das plantas. Esses

resultados levam a afirmar que a resistência em *R. raphanistrum* e *R. sativus* é nuclear, sendo facilmente transmitida para a próxima geração.

Tabela 14- Matéria seca da parte aérea (MSPA) média e sobrevivência de plantas F1, oriundas de cruzamentos recíprocos entre populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, resistentes (HR<sub>Rr1</sub>, HR<sub>Rr2</sub>, HR<sub>Rs1</sub> e HR<sub>Rs2</sub>) e suscetíveis (HS<sub>Rr3</sub> e HS<sub>Rs3</sub>) aos herbicidas inibidores da ALS, 30 dias após aplicação do herbicida metsulfurom-metil

<i>R. raphanistrum</i> 30 DAA				
Cruzamentos	Nº de plantas		MSPA $\bar{X}$ (g planta <sup>-1</sup> )	Sobrevivência (%)
	Inicial	Final		
HR <sub>Rr1</sub> ♀ x HS <sub>Rr3</sub> ♂	62	48	1,03	77
HR <sub>Rr2</sub> ♀ x HS <sub>Rr3</sub> ♂	11	11	0,60	100
HS <sub>Rr3</sub> ♀ x HR <sub>Rr1</sub> ♂	21	21	0,80	100
HS <sub>Rr3</sub> ♀ x HR <sub>Rr2</sub> ♂	37	33	1,0	89
HS <sub>Rr3</sub> ♀	15	0	0	0
Desv. Padrão ( $\sigma$ )			0,377	
<i>R. sativus</i> 30 DAA				
HR <sub>Rs1</sub> ♀ x HS <sub>Rs3</sub> ♂	29	29	0,80	100
HR <sub>Rs2</sub> ♀ x HS <sub>Rs3</sub> ♂	14	13	0,48	93
HS <sub>Rs3</sub> ♀ x HR <sub>Rs1</sub> ♂	11	11	0,73	100
HS <sub>Rs3</sub> ♀ x HR <sub>Rs2</sub> ♂	21	20	0,36	95
HS <sub>Rs3</sub> ♀	17	0	0	0
Desv. Padrão ( $\sigma$ )			0,286	

♂ = doador de pólen (pai); ♀ = doador de citoplasma (mãe); ♀ = autopolinizado.

Em *Euphorbia heterophylla*, resistente aos herbicidas inibidores da ALS, a resistência é controlada por um alelo nuclear dominante (VARGAS; BORÉM; SILVA, 2001). Esses resultados corroboram com essa pesquisa, onde indica ausência de herança citoplasmática, caracterizando herança nuclear dominante. Já em *Solanum ptychanthum*, resistentes aos herbicidas inibidores da ALS devido a mutação Ala-205-Val, a herança da resistência mensurada através de cruzamentos entre populações resistentes e suscetíveis,

demonstrou um único gene nuclear, com dominância incompleta que controla a resistência (ASHIGH; RAJCAN; TARDIF, 2008). Em *Papaver rhoeas*, portando as mutações Pro-197 para His, Thr e Ser no gene ALS, causou padrões de resistência cruzada aos herbicidas ALS. A análise de progênie determinou que a resistência é herdada como traços monogênico dominante (SCARABEL et al., 2004).

Essas duas espécies de *Raphanus* possuem fecundação cruzada, dessa forma, o fluxo gênico faz com que a resistência dominante seja dispersada com facilidade entre populações. Conforme Vargas, Borém e Silva (2001) as características com herança do tipo nuclear têm disseminação rápida na população, via pólen, em espécies de fecundação cruzada. Yu e Powles (2014) constataram que, especialmente em espécies diplóides, os alelos de resistência aos inibidores da ALS são dominantes sobre os alelos suscetíveis do tipo selvagem. Isto significa que as plantas resistentes heterozigóticas podem sobreviver às doses normais recomendadas de herbicidas inibidores de ALS, facilitando a rápida propagação de alelos ALS resistentes.

Mesmo vários herbicidas pertencentes a outros mecanismos de ação exercer controle eficiente em todas as populações em estudo, o manejo da resistência em *Raphanus* spp. não pode ser dependente apenas do controle químico. É necessário adotar diferentes estratégias a fim de evitar e prevenir novos casos de resistência a estes herbicidas. A exemplo disso, biótipos de *R. raphanistrum*, em áreas de trigo na Austrália, evoluíram resistência ao herbicida 2,4-D (WALSH; OWEN; POWLES, 2007). A herança da resistência ao 2,4-D nessas populações é monogênica com total dominância (BUSI; POWLES, 2017). Mecanismos de resistência monogênicos e altamente dominantes com herança nuclear simples podem evoluir em plantas daninhas apesar das complexidades associadas com os modos de ação dos herbicidas envolvidos na seleção.

## 5.5 Conclusões

As populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, portadora da mutação Trp-574-Leu, possuem resistência cruzada aos herbicidas pertencentes aos grupos químicos sulfonilureias, imidazolinonas e triazolopirimidinas.

Os herbicidas atrazina, 2,4-D, glifosato, saflufenacil, bentazona, flumioxazina, glufosinato de amônia e tembotriona controlam eficientemente *Raphanus* spp. portadores da mutação Trp-574-Leu resistente aos herbicidas inibidores da ALS.

A herança da resistência, devido a sitio de ação alterado pela mutação Trp-574-Leu, nas espécies *R. raphanistrum* e *R. sativus* é dominante e nuclear.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resistência a herbicidas em plantas daninhas pode ser exemplo da evolução em resposta rápida a uma adversidade. Adversidade essa que é exercida pela aplicação rotineira de herbicidas fazendo com que a natureza biológica encontre saídas para tal problema. Essa resposta da biodiversidade já está presente nas populações de plantas e sua aptidão será potencializada se ocorrer a seleção através de um agente selecionador, no caso, o herbicida. Isso é exemplificado pelos mecanismos que conferem resistência aos herbicidas inibidores da ALS, onde grande número de substituições de bases nitrogenadas ocorrem no gene codificador da ALS, fazendo com que a enzima perca a afinidade para com o herbicida.

Resultados dessa pesquisa mostraram que as duas espécies de *Raphanus* spp. conferem resistência cruzada às três classes de herbicidas inibidores da ALS. Mesma substituição de aminoácido, proporcionando troca de sequência nucleotídica na mesma posição do gene que codifica a enzima ALS, mas a resposta a doses crescente do herbicida metsulfurom-metil varia entre as populações resistentes. Pode haver diferenças nos parâmetros cinéticos da enzima ALS, mas estes deveriam, ou seriam codificados e regidos pelo gene codificador da ALS. Como a base nucleotídica mutada, já conhecida na literatura por causar resistência a esses herbicidas, é a mesma em todas as populações, como poderia a resposta da enzima ser diferente? Já que não houve resistência metabólica pelo citocromo P450 monooxigenase envolvida? Cria-se expectativa ou pressuposto de que outras mutações observadas no gene ALS, como Ala-360-Ser, poderia ser precursora de possível mudança da afinidade da enzima com o herbicida. Mas para isso ser esclarecido necessita-se pesquisas mais aprofundadas, em relação a base molecular, nessas populações.

Outra consideração importante é a homozigose das populações, alcançada por autopolinização das plantas, sabendo-se que *R. raphanistrum* e *R. sativus* são espécies

que possuem alta taxa de polinização cruzada, o que as caracteriza espécies alógamas. Mas o efeito da homozigose, ou depressão endogâmica, gerado pela autopolinização pode ter grande responsabilidades na variação de resposta das populações ao estresse causado pelo herbicida *in vivo*, no experimento dose resposta. Mas no experimento *in vitro* (ensaio enzimático) a variação na resposta da enzima ALS e parâmetros enzimáticos, entre as populações resistentes de ambas espécies, não poderiam teoricamente ser afetados pela homozigose das populações. Esses efeitos poderiam estar relacionados com cerosidade da folha, absorção, vigor de plantas, etc. Então pode haver outros fatores envolvidos na resistência dessas populações aos herbicidas inibidores da ALS.

O manejo de resistência a plantas daninhas é complexo e, ainda há muitas dúvidas de como fazê-lo de forma correta. Muitas formas de manejo e prevenção é difundido pela pesquisa, mas a eficiência e impacto de cada um ou do conjunto deles não se sabe. Recentemente Beckie e Harker (2017) descreveram as dez melhores práticas de manejo de resistência em plantas daninhas. Entre essas recomendações, estão base de dados da lavoura, integralização de manejo químico e físico, conhecimento biológico e botânico das espécies que compõe a comunidade de plantas daninhas como nível de infestação e distribuição na lavoura, controle de entrada de propágulos e banco de semente da lavoura, rotações de mecanismos de ação de herbicidas e herbicidas residuais e pós-emergentes (com ressalvas), classificação de herbicidas de alto risco de selecionar resistência (caso dos inibidores da ALS e ACCase), misturas de herbicidas inclusive nas formulações de mercados devem ser priorizadas, pesquisas mais aprofundadas sobre a biologia das plantas daninhas como o conhecimento também da cultura a ser implantada e, uso de culturas competitivas e manejo de coberturas de solo.

A ressalva importante colocada por esses autores em relação a rotação de mecanismos de ação e modo de ação dos herbicidas, é que essas práticas por si só não são suficientes para o manejo e prevenção da resistência em plantas daninhas. Isso vai de encontro com resultados do capítulo III em relação a herbicidas alternativos. É importante frisar que esses herbicidas que poderão ser úteis no manejo dessas populações resistentes, não poderão ser utilizados de forma isolada e sim, utilizados dentro de um programa integrado de controle e prevenção de plantas daninhas resistentes a herbicidas. Por fim,

voltando a falar de biodiversidade em plantas daninhas, mencionado no início desse texto, isso foi confirmado no experimento da herança da resistência das populações em estudo, onde o gene responsável pela codificação possui dominância nuclear completa. Esse fato é importante devido essas duas espécies serem de polinização cruzada, havendo ainda a probabilidade de fluxo gênico com outras espécies pertencentes a família *Brassicaceae*, como do gênero *Brassica*, por exemplo (GUERITAINE et al., 2002; WARWICK; FRANCIS, 2005). Por esse motivo, o manejo dessas populações resistentes e das espécies *R. raphanistrum* e *R. sativus*, em geral, deve ser realizado de forma cautelosa.



## 7 CONCLUSÃO GERAL

O mecanismo de resistência aos herbicidas inibidores da ALS em populações de *Raphanus raphanistrum* e *R. sativus* é devido a sítio de ação alterado. A substituição da base nitrogenada ocorrida na sequência nucleotídica do gene ALS, posição 574, é Triptofano (Trp) para leucina (Leu). Parâmetros cinéticos da enzima ALS podem estar envolvidos nos padrões de resistência dessas espécies.

Não há envolvimento de resistência metabólica, pelo citocromo P<sub>450</sub> monooxigenase, na resistência de *R. raphanistrum* e *R. sativus* aos herbicidas inibidores da ALS.

Populações de *R. raphanistrum* e *R. sativus*, portadores da mutação Trp-574-Leu, possuem resistência cruzada aos grupos químicos sulfoniluréias, imidazolinonas e triazolopirimidinas. Os herbicidas atrazina, 2,4-D, glifosato, saflufenacil, bentazona, flumioxazina, glufosinato de amônia e tembotriona são alternativas de controle para essas populações.

A herança da resistência em *R. raphanistrum* e *R. sativus* possui dominância completa e nuclear.

## REFERÊNCIAS

AL-MOUEMAR, A.; DARMENCY, H. Lack of stable inheritance of introgressed transgene from oilseed rape in wild radish. **Environmental biosafety research**, v. 3, n. 4, p. 209-214, 2004.

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 1, p. 241-248, 2002.

ASHIGH, J.; RAJCAN, I.; TARDIF, F. J. Genetics of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors in populations of eastern black nightshade (*Solanum Ptychanthum*) from Ontario. **Weed Science**, v. 56, n. 2, p. 210-215, 2008.

ASHIGH, J.; TARDIF, F. An Ala<sub>205</sub>Val substitution in acetohydroxyacid synthase of Eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) reduces sensitivity to herbicides and feedback inhibition. **Weed Science**, v. 55, n. 6, p. 558-565, 2007.

ASHWORTH, M. B.; WALSH, M. J.; FLOWER, K. C.; POWLES, S. B. Identification of the first glyphosate-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) populations. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1432-1436, 2014.

BALBINOT Jr., A. A.; MORAES, A.; BACKES, R. L. Efeito de coberturas de inverno e sua época de manejo sobre a infestação de plantas daninhas na cultura de milho. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p. 473-480, 2007.

BECKIE, H. J.; HARKER, K. N. Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1045-1052, 2017.

BECKIE, H. J.; TARDIF, F. J. Herbicide cross resistance in weeds. **Crop Protection**, v. 35, n. 3, p. 15-28, 2012.

BECKIE, H. J., WARWICK, S. I.; SAUDER, C. A. Basis for herbicide resistance in Canadian populations of wild oat (*Avena fatua*). **Weed Science**, v. 60, n. 1, p. 10-18, 2012a.

\_\_\_\_\_. Acetolactate synthase (ALS) inhibitor-resistant wild buckwheat (*Polygonum convolvulus*) in Alberta. **Weed Technology**, v. 26, n. 1, p. 156-160, 2012b.

BETT, K. E.; LYDIATE, D. J. Genetic analysis and genome mapping in *Raphanus*. **Genome**, v. 46, n. 3, p. 423-430, 2003.

BIANCHI, M. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; RIZZARDI, M. A. Interferência de *Raphanus sativus* na produtividade de cultivares de soja. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 783-792, 2011.

BOUTSALIS, P.; KAROTAM, J.; POWLES, S. B. Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. **Pesticide Science**, v. 55, n. 5, p. 507-516, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BURGOS, N. R. Whole-plant and seed bioassays for resistance confirmation. **Weed Science**, v. 63, p. 152-165, 2015.

BURGOS, N. R.; TRANEL, P. J.; STREIBIG, J. C.; DAVIS, V. M.; SHANER, D.; NORSWORTHY, J. K.; RITZ, J. Review: confirmation of resistance to herbicides and evaluation of resistance levels. **Weed Science**, v. 61, n. 1, p. 4-20, 2013.

BUSI, R. VILA-AIUB, M. M.; BECKIE, H. J.; GAINES, T. A.; GOGGIN, D. E.; KAUNDUN, S. S.; LACOSTE, M.; NEVE, P.; NISSEN, S. J.; NORSWORTHY, J. K.; RENTON, M.; SHANER, D. L.; TRANEL, P. J.; WRIGHT, T.; YU, Q.; POWLES, S. B. Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 8, p. 1218-1221, 2013.

BUSI, R.; POWLES, S.B. Inheritance of 2,4-D resistance traits in multiple herbicide-resistant *Raphanus raphanistrum* populations. **Plant Science**, v. 257, n. 1, p. 1-8, 2017.

BUSI, R.; VILA-AIUB, M. M.; POWLES, S. B. Genetic control of a cytochrome P450 metabolism based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*. **Heredity**, v. 106, n. 5, p. 817-824, 2011.

CECHIN, J.; VARGAS, L.; AGOSTINETTO, D.; LAMEGO, F. P.; MARIANI, F.; Dal MAGRO, T. Mutation of Trp-574-Leu ALS gene confers resistance of radish biotypes to iodosulfuron and imazethapyr herbicides. **Acta Scientiarum**, v. 39, n. 3, p. 299-306, 2017.

CHEAM, A. H.; CODE, G. R. The biology of Australian weeds. 24. *Raphanus raphanistrum* L. **Plant Protection Quarterly**, v. 10, n. 1, p. 2-13, 1995.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Curvas de dose-resposta de biótipos resistente e suscetível de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da ALS. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 513-519, 2002.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; FILHO, R. V.; SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, n. 1, p. 13-20, 1994.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Londrina: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008, p. 9-34.

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

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**, v. 62, n. 7, p. 584-597, 2006.

COSTA, L. O.; RIZZARDI, M. A. Herbicidas alternativos para o controle de *Raphanus raphanistrum* L. resistente ao herbicida metsulfurom metílico. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 3, p. 268-276, 2013.

\_\_\_\_\_. Resistance of *Raphanus raphanistrum* to the herbicide metsulfuron-methyl. **Planta Daninha**, v. 32, n. 1, p. 181-187, 2014.

\_\_\_\_\_. Competitive ability of wheat in association with biotypes of *Raphanus raphanistrum* L. resistant and susceptible to ALS-inhibitor herbicides. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 2, p. 121-130, 2015.

CROSS, R. B.; McCARTY, L. B.; McELROY, J. S.; THARAYIL, N.; BRIDGES Jr, W. C. Comparison of enzyme and growth characteristics in ALS-inhibitor susceptible and resistant annual bluegrass (*Poa annua*) biotypes. **Weed Science**, v. 63, n. 1, p. 220-228, 2015.

DÉLYE, C.; JASIENIUK, M.; Le CORRE, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 649-658, 2013.

DÉLYE, C.; PERNIN, F.; SCARABEL, L. Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 333-342, 2011.

DENG, W.; YANG, Q.; ZHANG, Y.; JIAO, H.; MEI, Y.; LI, X.; ZHENG, M. Cross-resistance patterns to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides of flixweed (*Descurainia sophia* L.) conferred by different combinations of ALS isozymes with a Pro-197-Thr mutation or a novel Trp-574-Leu mutation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 136, n. 1, p. 41-45, 2017.

DEWAELE, E.; FORLANI, G.; DEGRANDE, D.; NIELSEN, E.; RAMBOUR, S. Biochemical characterization of chlorsulfuron resistance in *Cichorium intybus* L. var. Witloof. **Journal Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 109-114, 1997.

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

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

EBERLEIN, C. V.; GUTTIERI, M. J.; MALLORY-SMITH, C. A.; THILL, D. C.; BAERG, R. J. Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science**, v. 45, n. 2, p. 212-217, 1997.

ENDO, M.; SHIMIZU, T.; FUJIMORI, T.; YANAGISAWA, S.; TOKI, S. Herbicide-resistant mutations in acetolactate synthase can reduce feedback inhibition and lead to accumulation of branched-chain amino acids. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 5, p. 522-528, 2013.

ESLAMI, S. V.; GILL, G. S.; BELLOTTI, B.; McDONALD, G. Wild radish (*Raphanus raphanistrum*) interference in wheat. **Weed Science**, v. 54, n. 4, p. 749-756, 2006.

FENG, P. C. C.; TRAN, M.; CHIU, T.; SAMMONS, R. D.; HECK, G. R.; CaJACOB, C. A. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. **Weed Science**, v. 52, n. 4, p. 498-505, 2004.

GE, X.; D'AVIGNON, D. A.; ACKERMAN, J. J.; SAMMONS, R. D. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. **Pest Management Science**, v. 66, n. 4, p. 345-348, 2010.

GILBERT, N. Superweeds? Suicides? Stealthy genes? The true, the false and the still unknown about transgenic crops. Special issue. **Nature**, v. 497, p. 24-26, 2013.

GUERITAINE, G.; SESTER, M.; EBER, F.; CHEVRE, A. M.; DARMENCY, H. Fitness of backcross six of hybrids between transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Molecular Ecology**, v. 11, n. 8, p. 1419-1426, 2002.

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

HAN, H.; YU, Q.; CAWTHRAY, G. R.; POWLES, S. B. Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl. **Pest Management Science**, v. 69, n. 9, p. 996-1000, 2013.

HAN, H.; YU, Q.; PURBA, E.; LI, M.; WALSH, M.; FRIESEN, S.; POWLES, S. B. A novel amino acid substitution Ala-122-Tyr in ALS confers high-level and broad resistance across ALS-inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 68, n. 8, p. 1164-1170, 2012.

HAN, H.; YU, Q.; VILA-AIUB, M. M.; POWLES, S. B. Genetic inheritance of cytochrome P450-mediated metabolic resistance to chlorsulfuron in a multiple herbicide resistant *Lolium rigidum* population. **Crop Protection**, v. 65, n. 9, p. 57-63, 2014.

HASHEM, A.; BOWRAN, D.; PIPER, T.; DHAMMU, A. Resistance of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in the western Australia wheat belt weed. **Weed Technology**, v. 15, n. 1, p. 68-74, 2001a.

HASHEM, A.; DHAMMU, H. S.; POWLES, S. B.; BOWRAN, D. G.; PIPER, T. J.; CHEAM, A. H. Triazine resistance in a biotype of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) in Australia. **Weed Technology**, v. 15, n. 4, p. 636-641, 2001b.

HEALY-FRIED, M. L.; FUNKE, T.; PRIESTMAN, M. A.; HAN, H.; SCHÖNBRUNN, E. Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *E. coli* EPSP synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 45, p. 32949-32955, 2007.

HEAP, I. **Criteria for Confirmation of Herbicide-Resistant Weeds**: With specific emphasis on confirming low level resistance. Lawrence- USA, International Survey of Herbicide-Resistant Weeds, 2005. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Documents/ResistanceCriterion.pdf>> Acesso em: 18 fev. 2017.

\_\_\_\_\_. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1306-1315, 2014.

\_\_\_\_\_. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**, 2017. Disponível em: <[www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)>. Acesso em Fev. 2017.

HOLLOMON, D. W. Do we have the tools to manage resistance in the future? **Pest Management Science**, v. 68, n. 2, p. 149-154, 2012.

HOVICK, S. M.; CAMPBELL, L. G.; SNOW, A. A.; WHITNEY, K. D. Hybridization alters early life-history traits and increases plant colonization success in a novel region. **The American Naturalist**, v. 179, n. 2, p. 192-203, 2012.

KAMALA, T. A study on the cytogenetic homeologies between *Raphanus* and *Brassica* genomes. **Indian Journal Botânic**, v. 6, n. 2, p. 131-140, 1983.

KAUNDUN, S. S.; DALE, R. P.; BAILLY, G. C. Molecular basis of resistance to herbicide inhibiting-acetolactate synthase in two rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) populations from Australia. **Weed Science**, v. 60, n. 2, p. 172-178, 2012.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo II, 2 ed. São Paulo: Basf Brasileira, 1999. 978 p.

KOGER, C. H.; REDDY, K. N. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). **Weed Science**, v. 53, n. 1, p. 84-89, 2005.

KOLKMAN, J. M.; SLABAUGH, M. B.; BRUNIARD, J. M.; BERRY, S.; BUSHMAN, B. S.; OLUNGU, C.; MAES, N.; ABRATTI, G.; ZAMBELLI, A.; MILLER, J. F.; LEON, A.; KNAPP, S. J. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 6, p. 1147-1159, 2004.

LAMEGO, F. P.; CHARLSON, D.; DELATORRE, C. A.; BURGOS, N. R.; VIDAL, R. A. Molecular Basis of Resistance to ALS-Inhibitor Herbicides in Greater Beggarticks. **Weed Science**, v. 57, n. 5, p. 474-481, 2009.

LAMEGO, F. P.; FLECK, N. G.; BIANCHI, M. A.; SCHAEGLER, C. E. Tolerância à interferência de plantas competidoras e habilidade de supressão por genótipos de soja. Respostas de variáveis de produtividade. **Planta Daninha**, v. 22, n. 4, p. 491-498, 2004.

LÉGÈRE, A.; STEVENSON, C.; BECKIE, H.; WARWICK, S.; JOHNSON, E.; HRYNEWICH, B. Growth characterization of kochia (*Kochia scoparia*) with substitutions at Pro197 or Trp574 conferring resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. **Pest Management Science**, v. 61, n. 2, p. 267-276, 2013.

LI, M.; YU, Q.; HAN, H.; VILA-AIUB, M.; POWLES, S. B. ALS herbicide resistance mutations in *Raphanus raphanistrum*: evaluation of pleiotropic effects on vegetative growth and ALS activity. **Pest Management Science**, v. 69, n. 6, p. 689-695, 2013.

LI, X.; GUO, W.; WANG, B.; LI, X.; CHEN, H.; WEI, L.; WANG, Y.; WU, J.; LONG, H. Instability of chromosome number and DNA methylation variation induced by hybridization and amphidiploid formation between *Raphanus sativus* L. and *Brassica alboglabra* Bailey. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 207-217, 2010.

LIU, W.; YUAN, G.; DU, L.; GUO, W.; LI, L.; BI, Y.; WANG, J. A novel Pro197Glu substitution in acetolactate synthase (ALS) confers broad-spectrum resistance across ALS inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 117, n. 5, p. 31-38, 2015.

LORENTZ, L.; GAINES, T. A.; NISSEN, S. J.; WESTRA, P.; STREK, H. J.; DEHNE, H. W.; RUIZ-SANTAELLA, J. P.; BEFFA, R. Characterization of Glyphosate Resistance in *Amaranthus tuberculatus* Populations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 32, p. 8134-8142, 2014.

LYSHEDE, O. B. Diagnostic differences in the seed coat structure in *Raphanus sativus* and *R. raphanistrum*. **Seed Science and Technology**, v. 10, n. 2, p. 167-178, 1982.

MADHOU, P.; WELLS, A.; PANG, E. C. K.; STEVENSON, T. W. Genetic variation in populations of Western Australian wild radish. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 10, p. 1079-1087, 2005.

MALLORY-SMITH, C.; RETZINGER, E. Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. **Weed Technology**, v. 17, n. 3, p. 605-619, 2003.

MATZRAFI, M.; LAZAR, T. W.; SIBONY, M.; RUBIN, B. *Conyza* species: distribution and evolution of multiple target-site herbicide resistances. **Planta**, v. 242, n. 1, p. 259-267, 2015.

McCOURT, J. A.; PANF. S. S.; KING-SCOTT, J.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G; Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 569-573, 2006.

McELROY, J. S.; FLESSNER, M. L.; WANG, Z.; DANE, F.; WALKER, R. H.; WEHTJE, G. R. A Trp<sub>574</sub> to leu amino acid substitution in the ALS gene of annual bluegrass (*Poa annua*) is associated with resistance to ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 61, n. 1, p. 21-25, 2013.

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**, v. 53, n. 1, p. 17-22, 2005.

MOLIN, W. T.; NANDULA, V. K.; WRIGHT, A. A.; BOND, J. A. Transfer and expression of ALS inhibitor resistance from palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to an *A. spinosus* × *A. palmeri* hybrid. **Weed Science**, v. 64, n. 2, p. 240-247, 2016.

MONQUEIRO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; DIAS, C. T. S. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da ALS na cultura da soja (*Glycine max*). **Planta Daninha**, v. 18, n. 3, p. 419-425, 2000.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.

OLIVEIRA NETO, A. M.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA Jr, R. S.; GUERRA, N.; DAN, H. A.; ALOSNO, D. G.; BLAINSKI, E.; SANTOS, G. Estratégias de manejo de inverno e verão visando ao controle de *Conyza bonariensis* e *Bidens pilosa*. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 1107-1116, 2010.

OWEN, M. J.; GOGGIN, D.; POWLES, S. B. Non-target-site-based resistance to ALS-inhibiting herbicides in six *Bromus rigidus* populations from Western Australian cropping fields. **Pest Management Science**, v. 68, n. 7, p. 1077-1082, 2012.



OWEN, M. D. K.; BECKIE, H. J.; LEESON, J. Y.; NORSWORTHY, J. K.; STECKEL, L. E. Integrated pest management and weed management in the United States and Canada. **Pest Management Science**, v. 71, n. 3, p. 357-376, 2015.

PANDOLFO, C. E.; PRESOTTO, A.; MORENO, F.; DOSSOU, I.; MIGASSO, J. P.; SAKIMA, J.; CANTAMUTTO, M. Broad resistance to acetohydroxyacid-synthase-inhibiting herbicides in feral radish (*Raphanus sativus* L.) populations from Argentina. **Pest Management Science**, v. 72, n. 2, p. 354-361, 2016.

PANDOLFO, C. E.; PRESOTTO, A.; POVERENE, M.; CANTAMUTTO, M. Limited occurrence of resistant radish (*Raphanus sativus*) to AHAS-inhibiting herbicides in Argentina. **Planta Daninha**, v. 31, n. 3, p. 657-666, 2013.

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

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. Review. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317-347, 2010.

POWLES, S. B. Global Herbicide Resistance Challenge. **Pest Management Science**, v. 70, Special Issue, p. 1305, 2014.

PRESTON, C.; STONE, L. M.; RIEGER, M. A.; BAKER, J. Multiple effects of a naturally occurring proline to threonine substitution within acetolactate synthase in two herbicide-resistant populations of *Lactuca serriola*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 3, p. 227-235, 2006.

RIGOLI, R. P.; AGOSTINETTO, D.; SCHAEGLER, C. E.; DAL MAGRO, T.; TIRONI, S. P. Habilidade competitiva relativa do trigo (*Triticum aestivum*) em convivência com azevém (*Lolium multiflorum*) ou nabo (*Raphanus raphanistrum*). **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2008.

RIZZARDI, M. A.; VIDAL, R. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 149-158, 2002.

SAHLI, H. F.; CONNER, J. K.; SHAW, F. H.; HOWE, S.; LALE, A. Adaptive differentiation of quantitative traits in the globally distributed weed, wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Genetics**, v. 180, n. 2, p. 945-955, 2008.

SANTOS, F. M.; VARGAS, L.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; AGOSTINETTO, D.; MARIANI, F.; DAL MAGRO, T. Differential susceptibility of biotypes of *Conyza sumatrensis* to chlorimuron-ethyl herbicide. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 427-435, 2014.

- SCARABEL, L.; CARRARO, N.; SATTIN, M.; VAROTTO, S. Molecular basis and genetic characterization of evolved resistance to ALS-inhibitors in *Papaver rhoeas*. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 703-709, 2004.
- SCHULER, M. A. Plant cytochrome P450 monooxygenases. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 15, n. 3, p. 235-284, 1996.
- SEEFELDT, S. S.; JENSEN, J. E.; FUERTS, E. P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed technology**, v. 9, n. 2, p. 218-227, 1995.
- SHANER, D. L. Resistance to acetolactate synthase (ALS) inhibitors in the United States: history, occurrence, detection and management. **Journal of Weed Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 405-411, 1999.
- SHANER, D. L.; BECKIE, H. J. The future for weed control and technology. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1329-1339, 2014.
- SHANER, D. L.; SINGH, B. K. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p. 1221-1226, 1993.
- SINGH, B. K.; STIDHAM, M. A.; SHANER, D. L. Assay of acetohydroxyacid synthase. **Analytical Biochemistry**, v. 171, n. 1, p. 173-179, 1988.
- SMIT, J.; CAIRNS, A. Resistance of *Raphanus raphanistrum* to chlorsulfuron in the Republic of South Africa. **Weed Research**, v. 41, n. 1, p. 41-47, 2001.
- STREIBIG, J. C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, v. 28, n. 6, p. 479-484, 1988.
- TAL, J. A.; HALL, J. C.; STEPHENSON, G. R. Non-enzymatic conjugation of fenoxaprop-ethyl with glutathione and cysteine in several grass species. **Weed Research**, v. 35, n. 3, p. 133-139, 1995.
- TAN, M. K.; MEDD, R. W. Characterisation of the acetolactato synthase (ALS) gene of *Raphanus raphanistrum* L. and the molecular assay of mutations associated with herbicide resistance. **Plant Science**, v. 163, n. 2, p. 195-205, 2002.
- 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.
- THEISEN, G. **Aspectos botânicos e relato a resistência de nabo silvestre aos herbicidas inibidores de ALS**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 26 p. (Documento 239).
- TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R.; HEAP, I. M. **Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em fev. 2017.

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

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Seletividade e eficiência de herbicidas em cereais de inverno. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 1, n. 3, p. 1-10, 2005.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A. A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2001.

VILA-AIUB, M. M.; GUNDEL, P. E.; PRESTON, C. Experimental methods for estimation of plant fitness costs associated with herbicide-resistance genes. **Weed Science**, v. 63, n. 1, p. 203-216, 2015.

VILA-AIUB, M. M.; YU, Q.; HAN, H.; POWLES, S. B. Effect of herbicide resistance endowing Ile-1781-Leu and Asp-2078-Gly ACCase gene mutations on ACCase kinetics and growth traits in *Lolium rigidum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 15, p. 4711-4718, 2015.

VILA-AIUB, M. M.; NEVE, P.; POWLES, S. B. Evidence for an ecological cost of enhanced herbicide metabolism in *Lolium rigidum*. **Journal Ecology**, v. 97, n. 4, p. 772-780, 2009a.

\_\_\_\_\_. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 751-767, 2009b.

WALSH, M. J.; DUANE, R. D.; POWLES, S. B. High frequency of chlorsulfuron-resistant wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations across the western Australian wheatbelt. **Weed Technology**, v. 15, n. 2, p. 199-203, 2001.

WALSH, M. J.; OWEN, M. J.; POWLES, S. B. Frequency and distribution of herbicide resistance in *Raphanus raphanistrum* populations randomly collected across the western Australian wheat belt. **Weed Research**, v. 47, n. 6, p. 542-550, 2007.

WALSH, M. J.; POWLES, S. B.; BEARD, B. R.; PARKIN, B. T.; PORTER, S. A. Multiple-herbicide resistance across four modes of action in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). **Weed Science**, v. 52, n. 1, p. 8-13, 2004.

WALSH, M. J.; POWLES, S. B. Management of herbicide resistance in wheat cropping systems: learning from the Australian experience. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1324-1328, 2014.

WARWICK, S. I.; FRANCIS, A. The biology of Canadian weeds. 132. *Raphanus raphanistrum* L. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, n. 3, p. 709-733, 2005.

WARWICK, S. I.; SAUDER, C.; BECKIE, H. J. Resistance in Canadian biotypes of wild mustard (*Sinapis arvensis*) to acetolactate synthase inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 53, n. 5, p. 631-639, 2005.

WERCK-REICHHART, D.; HEHN, A.; DIDIERJEAN, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 116-123, 2000.

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**, v. 55, n. 2, p. 83-90, 2007.

XAVIER, E.; OLIVEIRA, M. C.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A.; DIESEL, F.; PAGNONCELLI, F. D.; SCALCON, E. Acetolactate synthase activity in *Euphorbia heterophylla* resistant to ALS and PROTOX inhibiting herbicides. **Planta Daninha**, v. 31, n. 4, p. 867-874, 2013.

YAMAGISHI, H.; TERACHI, T. Multiple origins of cultivated radishes as evidenced by a comparison of the structural variations in mitochondrial DNA of *Raphanus*. **Genome**, v. 46, n. 1, p. 89-94, 2003.

YAMANE, K.; LÜ, N.; OHNISHI, O. Chloroplast DNA variations of cultivated radish and its wild relatives. **Plant Science**, v. 168, n. 3, p. 627-634, 2005.

YANG, Y.; TAI, P.; CHEN, Y.; LI, W. A study of the phylogeny of *Brassica rapa*, *B. nigra*, *Raphanus sativus*, and their related genera using noncoding regions of chloroplast DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 268-275, 2002.

YOSHIMURA, Y.; BECKIE, H. J.; MATSUO, K. Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in western Canada. **Environmental Biosafety Research**, v. 5, n. 2, p. 67-75, 2006.

YU, Q.; HAN, H.; LI, M.; PURBA, E.; WALSH, M. J.; POWLES, S. B. Resistance evaluation for herbicide resistance-endowing acetolactate synthase (ALS) gene mutations using *Raphanus raphanistrum* populations homozygous for specific ALS mutations. **Weed Research**, v. 52, n. 2, p. 178-186, 2012.

YU, Q.; COLLAVO, A.; ZHENG, M. Q.; OWEN, M.; SATTIN, M.; POWLES, S. B. Diversity of acetyl-coenzyme a carboxylase mutations in resistant *Lolium* populations: evaluation using clethodim. **Plant Physiology**, v. 145, n. 2, p. 547-558, 2007.

YU, Q.; HAN, H.; NGUYEN L.; FORSTER, J. W.; POWLES, S. B. Paraquat resistance in a *Lolium rigidum* population is governed by one major nuclear gene. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 8, p. 1601-1608, 2009.

YU, Q.; HAN, H.; VILA-AIUB, M. M.; POWLES, S. B. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 14, p. 3925-3934, 2010.

YU, Q.; POWLES, S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: current understanding. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1340-1350, 2014.

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**, v. 51, n. 6, p. 831-838, 2003.

YUAN, J. S.; TRANEL, P. J.; STEWART Jr., C. N. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2007.

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



## **PPGAgro**

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

**Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV**